

Aus dem Veterinär-Physiologischen Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Evaluierung und Anwendung einer neuen Messmethode zur  
funktionellen Charakterisierung intrinsischer nervaler  
Schaltkreise am porcinen Colon**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Thomas Breuer (geb. Otto)  
aus Oelsnitz im Vogtland

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: PD Dr. Helga Pfannkuche

Gutachter: PD Dr. Helga Pfannkuche, Veterinär-Physiologisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Gemma Mazzuoli-Weber, Institut für Physiologie und Zellbiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 07. September 2021

Meinen Kindern Linus und Timon

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht .....	3
2.1	Funktionen des porcinen Colons .....	3
2.2	Aufbau des Colons .....	3
2.2.1	Makroskopischer Aufbau .....	3
2.2.2	Mikroskopischer Aufbau .....	3
2.3	Darmmotilität .....	3
2.3.1	Myogene Mechanismen .....	4
2.3.2	Gastrointestinale Hormone .....	6
2.3.3	Enterisches Nervensystem (ENS) .....	7
2.3.4	Extrinsische Steuerung .....	14
2.3.5	Motilitätsmuster im Colon verschiedener Tierarten .....	14
2.3.6	Spezielle Motilitätsmuster im porcinen Colon .....	16
2.4	Untersuchungen der Darmmotilität .....	17
2.4.1	Untersuchungen in vivo .....	17
2.4.2	Untersuchungen in vitro .....	17
2.5	Bedeutung der Befunde für die vorliegende Arbeit .....	19
3	Material und Methoden .....	20
3.1	Versuchsvorbereitung .....	20
3.1.1	Gewinnung des Organmaterials .....	20
3.1.2	Gewebeaufbereitung .....	20
3.2	Versuchsanordnung .....	20
3.2.1	Apparatur: 1, eindimensionale Motilitätsmessung .....	21
3.2.2	Apparatur 2: zweidimensionale Motilitätsmessung .....	23
3.2.3	Elektrische Feldstimulation (EFS) .....	25
3.2.4	Hemmstoffe .....	26
3.3	Versuchsdurchführung .....	26
3.3.1	Voruntersuchungen .....	27
3.3.2	Funktionelle Charakterisierung enterischer Schaltkreise .....	28
3.3.3	Datenauswertung und Statistik .....	29

4	Ergebnisse .....	32
4.1	Voruntersuchungen.....	32
4.1.1	TTX-Sensitivität der EFS-induzierten Muskelantworten .....	32
4.1.2	Funktioneller Ausschluss einer direkten EFS-Wirkung außerhalb des Stimulationsortes .....	33
4.2	Funktionelle Charakterisierung enterischer Schaltkreise.....	34
4.2.1	Spontanmotilität .....	34
4.2.2	Nerv-Muskel-Antworten nach elektrischer Feldstimulation .....	40
5	Diskussion .....	83
5.1	Methodendiskussion .....	83
5.2	Diskussion der Messergebnisse von Apparatur 1 und 2 .....	85
5.2.1	Spontanmotilität .....	85
5.2.2	Nerv-Muskel-Antworten nach Elektrischer Feldstimulation .....	90
6	Zusammenfassung .....	96
7	Summary .....	98
8	Literaturverzeichnis	
	Danksagung	

## Abkürzungen

A	anal
Abb.	Abbildung
AC	Acetylcholin
AD	Analog-Digital
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CH	Schweiz
ChAT	Cholin – Acetyltransferase
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMMC	Colonic migrating motor complexes
CO	Kohlenstoffmonoxid
D	Deutschland
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
EC	Enterochromaffin
EFS	Elektrische Feldstimulation
ENS	enterisches Nervensystem
EPSP	erregende postsynaptische Potentiale
g	Gram
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GMC	riesige Migrationskontraktionen
GTP	Guanosintriphosphat
HAPC	high amplitude propagated contractions
Hex	Hexamethonium
Hz	Hertz
ICC	Interstitielle Zellen nach Cajal

IPAN	intrinsischen primär afferente Neurone
ISN	intrinsischen sensorischen Neuronen
ISP	innerer submuköser Plexus
kg	Kilogramm
LDC	long distance contractions
LDC	rhythmic long distance contractions
LM	Longitudinalmuskulatur
L-NAME	NG Nitro L arginine methylester Hydrochlorid
M	medial
m	Meter
mAChR	muskarinische Acetylcholinrezeptoren
MDT	Magendarmtrakt
MEN	mechanosensitiven enterischen Neurone
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMC	migrating motor complex
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
N	Newton
NKA	Neurokinin A
nNOS	neuronale Stickoxid Synthase
NO-GC	NO-sensitiven Guanylylcyclase
NOS	Stickoxid Synthase
NPY	Neuropeptid Y
NT	Neurotransmitter
Ø	Durchmesser
O	oral
OSP	äußerer submuköser Plexus
P	Phosphor
PACAP	Hypophysen-Adenylat-Cyclase-aktivierendes Polypeptid
PDGFR $\alpha$ +	platelet derived growth factor receptor $\alpha$
PRKG1	c-GMP-abhängige Proteinkinase 1
PYY	Peptid YY
RAMEN	Rapidly adapting mechanosensitive enteric
RPC	Rhythmic Phasic Contractions
RPC	rhythmische phasische Kontraktionen

RPMC	rhythmic propagating motor complexes
s	Sekunde
SAMEN	Slowly adapting mechanosensitive enteric neurons
SD	Standardabweichung
SMC	smooth muscle cells
TC	tonische Kontraktionen
TTX	Tetrodotoxin
UK	United Kingdom
USAMEN	Ultra-slowly adapting mechanosensitive enteric neurons
V	Volt
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
ZM	zirkulär Muskulatur
ZNS	zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)



# 1 Einleitung

Das Verdauungssystem von Säugetieren hat eine Vielzahl von Aufgaben. Diese unterliegen einer komplexen Steuerung durch das Zusammenspiel verschiedener Kontrollinstanzen. Zu diesen Kontrollinstanzen gehört auch das intrinsische, sogenannte enterische Nervensystem (ENS), welches aus einem in Ganglien angeordneten Netzwerk von Nervenzellen besteht.

Lange Zeit war die Erforschung der gastrointestinalen Motilität auf den Effektor d.h. die glatte Muskulatur, fokussiert. Mittlerweile hat sich der Schwerpunkt der Untersuchungen hin zur Steuerung der Motilität und damit zu den intrinsischen neuronalen Strukturen im Magen-Darm-Trakt (MDT) und den Interaktionen zwischen zentralem und enterischem Nervensystem (Brain-Gut-Axis) verschoben. Die Untersuchungen zeigten, dass die komplexe nervale Steuerung der gastrointestinalen Motilität eine sehr feine Abstimmung der motorischen Aktivität an intraluminale Nährstoffzusammensetzung und Nahrungsmenge erlaubt (FUKUI et al. 2018; KASHYAP et al. 2013; LE SCIELLOUR et al. 2018). Dies ermöglicht unter anderem eine schnelle Adaptation z.B. an veränderte Fütterungsbedingungen (OHASHI et al. 2001).

Die Kenntnis über die nervale Steuerung der gastrointestinalen Muskulatur ist auch aus pathophysiologischer Sicht relevant. Störungen der Darmmotilität haben ihre Ursache nämlich nicht nur in pathophysiologischen Vorgängen in der glatten Muskulatur, sondern auch in Dysfunktionen des ENS und/oder des zentralen Nervensystems (ZNS) (BEGLINGER 2007). Solche Dysfunktionen können erhebliche Veränderungen des Transits hervorrufen und Symptomaten wie Durchfall, Verstopfung, Bauchschmerzen, Dysphagie oder Blähungen nach sich ziehen (BEGLINGER 2007).

Der Anteil des enterischen Nervensystems in der Ätiologie gastrointestinalen Funktionsstörungen spielt sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin eine herausragende Rolle. Aus diesem Grund kommt der Untersuchung von Regulationsmechanismen der Magen-Darm-Motilität durch das ENS eine besondere Bedeutung zu. Für solche Untersuchungen ist das Colon von großem Interesse, da seine Motilitätsmuster differenziert reguliert werden müssen. Das Colon muss einerseits eine Speicherung des Chymus zur mikrobiellen Fermentation und zur Eindickung der Ingesta durch entsprechende Motilitätsmuster gewährleisten. Andererseits muss durch propulsive Peristaltik ein rechtzeitiger Weitertransport des Chymus gewährleistet sein, bevor es durch zu lange Verweildauer zu einer zu starken Eindickung des Inhalts kommt (SARNA und SHI 2006). Nach SARNA (2010) verfügt das Colon über eine sehr hohe Variabilität und Unvorhersehbarkeit der Motilitätsmustern an jeder beliebigen Stelle im Dickdarm. Frequenz, Amplitude und Zeitpunkt ihres Auftretens sind im Vergleich zum Dünndarm sehr heterogen. Dies hebt hervor dass die lokale Steuerung der Motilität im Colon eine wichtige Rolle hinsichtlich Physiologie und Pathophysiologie einnimmt.

Die in der Vergangenheit zur Untersuchung der nervalen Regulation der Colonmotorik eingesetzten in-vitro Techniken ließen keine simultanen Messungen an Zirkulär- (ZM) und Längsmuskulatur (LM) zu. Somit war auch die Möglichkeit der Erfassung lokaler enterischer Reflexe sowie die gegenseitige Beeinflussung der beiden Muskelschichten bei Aktivierung enterischer Neurone methodisch begrenzt. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer neuen Messmethode zur funktionellen Charakterisierung enterischer Schaltkreise im Colon. Dabei sollte die motorische Aktivität von Zirkulär- und Längsmuskulatur simultan an einem Präparat erfasst werden können. Insbesondere sollten die Einflüsse cholinерger und nitrерger enterischer Neurone als Hauptkomponenten der lokalen Regulation charakterisiert werden.

Da der Gastrointestinaltrakt des Schweines viele Ähnlichkeiten mit dem des Menschen hat, insbesondere bezüglich der Steuerung gastrointestinaler Funktionen durch das ENS, sind die Ergebnisse sicher nicht nur von veterinär- sondern auch von humanmedizinischem Interesse, da das Schwein ein gutes Modelltier für die Physiologie und Pathophysiologie des Magen-Darm-Traktes des Menschen ist (STEVENS et al. 1986, HENS et al. 2000, BROWN und TIMMERMANS 2004). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen dieser Arbeit am porcinen Colon durchgeführt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Funktionen des porcinen Colons

Zu den physiologischen Funktionen des Colons zählen in der Hauptsache die Resorption von Nährstoffen, Wasser und Elektrolyten, die Speicherung der Ingesta, aber auch die Abwehr körperfremder Agentien und schließlich der Weitertransport des Chymus bis hin zur Defäkation (DEGEN 2007). Außerdem gibt es noch weitere, tierartlich unterschiedliche Funktionen. Beim Schwein als Omnivore, wie auch bei dickdarmverdauenden Herbivoren, nimmt für die Spaltung von bis dahin unverdaulichen Pflanzenbestandteilen die Hydrolyse von Zellulose im *Colon ascendens* eine besondere Stellung ein. Hier werden, ähnlich wie in den Vormägen des Wiederkäuers, pflanzliche Gerüstsubstanzen durch mikrobielle Verdauung zu Fettsäuren und weiteren Syntheseprodukten umgesetzt und resorbiert (SALOMON et al. 2020, ENGELHARDT et al. 2015). Die weiteren Abschnitte *Colon transversum* und *descendens* dienen neben der Resorption von Wasser und Elektrolyten, was zur Eindickung der Ingesta und zur letztlichen Kotbildung führt, auch als Speicherort (SALOMON et al. 2020).

### 2.2 Aufbau des Colons

#### 2.2.1 Makroskopischer Aufbau

Nach ENGELHARD et al. (2015) hat das Colon eines erwachsenen Hausschweines eine Länge von 3,5 – 6 m. Das Verhältnis Körperlänge zur Gesamtlänge des Magen-Darm-Traktes beträgt dabei beim erwachsenen Schwein 1:14, wobei das Volumen zu 30 % auf den Magen, 33 % auf den Dünndarm und 37 % auf den Dickdarm verteilt ist (ENGELHARDT et al. 2015). Beim Schwein ist das *Colon ascendens* stark erweitert mit einer charakteristischen Spiralfigur. Diese *Ansa spiralis coli* hat die Form eines stumpfen Kegels und erinnert in der Gestalt an einen Bienenkorb. Die *Ansa spiralis coli* besteht aus mehreren Windungen. Innen sind die *Gyri centrifugales* und außen die *Gyri centripedales*, welche über die *Flexura centralis* verbunden sind. Die *Gyri centripedales* gehen in das *Colon transversum* und dieses mit Beginn der *Plica duodeno colica* ins *Colon descendens* über (SALOMON et al. 2020, LIEBICH 2002).

#### 2.2.2 Mikroskopischer Aufbau

Die Wand des Colons besteht aus der *Tunica mucosa*, der *Tela submucosa*, der *Tunica muscularis* und der *Tunica serosa*. Die *Tunica mucosa* kann weiter unterteilt werden in das *Epithelium mucosae*, die *Lamina propria mucosae* und die *Lamina muscularis mucosae* (SALOMON et al. 2020). Die *Tunica muscularis* besteht aus dem inneren *Stratum circulare* und dem äußeren *Stratum longitudinale*. Der gesamte MDT wird vom Ösophagus bis hin zum Rektum von einem Nervenplexus durchzogen, welches sich anatomisch in zwei eigenständige ganglienzellhaltige Plexus unterteilen lässt, den *Plexus submucosus* und den *Plexus myentericus* (Details siehe 2.3.3.1) (SALOMON et al. 2020).

### 2.3 Darmmotilität

Aufgabe der Darmmotilität ist es, den Darminhalt entlang des Darmrohrs vorwärts zu transportieren, die verschiedenen Bestandteile mit Verdauungssekreten zu vermischen und sie mit den absorptiven Oberflächen in Kontakt zu bringen, einen vorübergehenden Verbleib in bestimmten Darmregionen zu ermöglichen, die retrograde Bewegung des Darminhalts zu verhindern und nichtverdauliche Überreste zu entfernen

(BOECKXSTANS et al. 2006). Die wesentlichsten Motilitätsmuster, durch die diese Anforderungen realisiert werden, sind peristaltische und antiperistaltische Wellen, aboral wandernde Segmentationskontraktionen, Haustrenbewegungen und aboral laufende Riesenkontraktionen (ENGELHARDT et al. 2015).

Der Transit der Ingesta erfolgt ab dem Zeitpunkt des Abschluckens unwillkürlich (SALOMON et al. 2020). Zunächst wird sie im Magen gespeichert, weiter zerkleinert und kontrolliert aus diesem entleert: Flüssige Nahrungsbestandteile werden sehr schnell, festere Nahrungsbestandteile dagegen verzögert weitergegeben (BEGLINGER 2007). Die Passage durch den Dünndarm erfolgt zügig und relativ gleichmäßig, während der Transit durch den Dickdarm Stunden bis Tage dauern kann. Jede Region des MDTs erfüllt eine ganz spezifische Rolle im Aufschluss der Nahrung zur letztlichen Nährstoffaufnahme (HANSEN 2003). Ebenso verfügt jeder funktionelle Abschnitt des MDT über eigene Motilitätsmuster, um die Verdauung den Anforderungen entsprechend zu bewerkstelligen. Diese Motilitätsmuster variieren jedoch speziesabhängig (ENGELHARDT et al. 2015). Die Motilität ist zudem nicht zwangsläufig an das Vorhandensein von Nahrung geknüpft, sondern läuft auch ab, wenn keine Nahrung im Darm zu verarbeiten ist. In dieser Zeit werden spezielle Motilitätsprogramme, wie der migrating motor complex (MMC) gestartet, um das Darmrohr frei von nichtverdaulichen Substanzen, abgestorbenen Darmzellen oder nicht erwünschten Bakterien zu halten (SZURSZEWSKI 1969).

Allen im Gastrointestinaltrakt auftretenden Motilitätsmustern liegt eine gerichtete Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur zugrunde. Dabei werden die Muskeln des Gastrointestinaltraktes (GIT) durch verschiedene neuronale und nicht-neuronale Faktoren kontrolliert. Es kann dabei zunächst zwischen myogenen und neuronalen Kontrollmechanismen unterschieden werden. Zusätzlich modulieren endokrine und parakrine Faktoren die intestinale Motorik. Entzündungsmediatoren spielen darüber hinaus eine Rolle bei der Anpassung der Motilität an pathophysiologische Zustände (SANDERS et al. 2006).

Generell erfolgt die Steuerung der gastrointestinalen Motilitätsmuster zunächst autonom, das heißt, dass für die Erzeugung und Regulation der Kontraktionsmuster kein Input von extrinsischen Nerven oder Hormonen notwendig ist (SARNA 2010). Allein die glatten Muskelzellen und enterischen Neurone sind gemeinsam hauptverantwortlich für die autonome Funktionalität und Regulation der Motilitätsmuster (SARNA 2010). Eingaben aus externen Quellen und übergeordneten Zentren, wie sympathische und parasympathische Neurone, parakrine, endokrine und exokrine Hormone, wie auch Entzündungs- oder Stressmediatoren, können jedoch die myogene und die intrinsische neuronale Regulation beeinflussen, um die Darmkontraktionen auf Veränderungen der äußeren Umgebung anzupassen (SARNA 2010). Hierbei innervieren die autonomen Nerven die glatte Muskulatur nicht direkt, sondern modulieren vielmehr die Aktivität des enterischen Nervensystems, wodurch letztlich die gesamte Motilität beeinflusst wird (SARNA 2010).

### **2.3.1 Myogene Mechanismen**

Aktivitäten im MDT, die ohne nervalen Input durch Schrittmacherzellen induziert werden, werden als myogen bezeichnet. Im Gegensatz zum Herzen gibt es im MDT keinen singulären Schrittmacher. Vielmehr gibt es ein kontinuierliches Netzwerk von elektrisch verbundenen Schrittmacherzellen (SANDERS et al. 2006). Die Bereiche mit Schrittmachern in der gastrointestinalen Muskulatur beinhalten verschiedene Zelltypen, unter anderem enterische Neurone, Glia-Zellen, glatte Muskelzellen, Interstitielle Zellen nach Cajal (ICC), Immunzellen, und Fibroblasten-ähnliche Zellen (SANDERS et al. 2006). Das über Gap junctions verbundene, multizelluläre Synzytium von glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs), ICCs und den Fibroblasten-

ähnlichen PDGFR $\alpha$ + (platelet derived growth factor receptor  $\alpha$ ) Zellen wird als „SIP-Synzytium“ bezeichnet (SANDERS et al. 2016).

Eine herausragende Rolle für die Schrittmacheraktivität des SIP-Synzytiums spielen die ICCs. Sie wurden erstmals 1911 beschrieben (CAJAL 1911) und sind rhythmisch aktive Zellen, welche Membranpotentialschwankungen (Slow waves) erzeugen und diese passiv im Zellverband übertragen (HUIZINGA et al. 1995, WARD et al. 1994). Jeder peristaltischen Bewegung geht eine Kontraktion der ZM voraus, welche wiederum die Folge einer Depolarisation der Muskelzelle durch das Einströmen von Kalzium über spannungsempfindliche Kalziumkanäle und (im Darm weniger wichtig) Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern ist. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle ändert sich bei einer Slow wave von niedrig (Ruhepotential oder maximales Potential zwischen den Slow waves von -80 bis -55mV) zu hoch (Peak Depolarisation bis etwa -40 bis -25 mV). Über drei Hauptmechanismen wird dann das Membranpotential über den Schwellenwert für den Kalziueinstrom gebracht, um ein Aktionspotential (AP) auszulösen: Muskeldehnung, exzitatorische Neurotransmission oder Hemmung der inhibitorischen Neurotransmission (HUIZINGA und LAMMERS 2009). Durch Öffnung der spannungsabhängigen Ca-Kanäle kommt es zu einem periodischen Eintritt von Ca<sup>2+</sup> und schließlich zu phasischen Kontraktionen. Form, Frequenz, Amplitude und Dauer der Slow waves variieren nicht nur bei verschiedenen Spezies, sondern auch in verschiedenen Teilen des MDTs. Auch geringe Potentialschwankungen können zum Zeitpunkt des Peaks einer Slow waves großen Einfluss auf den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> und die Kontraktion haben (SANDERS et al. 2006). Da die glatte Muskulatur im gesamten MDT über spezielle elektrische Zell-Zell-Kontakte verfügt und die ICC über netzwerkartige Fortsätze miteinander verbunden sind, können die Slow waves auf Nachbarzellen übertragen werden (HUIZINGA und LAMMERS 2009). Dies hat eine lokale Synchronisation der Kontraktionen zur Folge (HUIZINGA und LAMMERS 2009).

Die ICCs können anhand ihrer Lokalisation und zum Teil auch anhand ihrer Funktion unterschieden werden: ICCs zwischen der ZM und der LM, die im Dünndarm im Bereich des myenterischen Plexus liegen, werden als ICC-MY oder ICC-MP bezeichnet und erzeugen Slow waves (SANDERS et al. 2006, PLUJA et al. 2001). Im Plexus submucosus des Colons gibt es ICC-SMP, die für die Slow waves im Colon verantwortlich sind (RAE et al. 1998, LANGTON et al. 1989, PLUJA et al. 2001). Im tiefen muskulären Plexus des Dünndarms liegen ICC-DMPs. Da sie synapsen-ähnliche Übergänge zu cholinergen und nitrergen Nerven bilden, sowie Gap junctions mit glatten Muskelzellen, ist es wahrscheinlich, dass sie bei der cholinergen und nitrergen Muskelinnervation durch ICC eine Rolle spielen (WANG et al. 2003). ICC-SS liegen subserosal, sind bi- oder multipolar bzw. sternförmig und haben sehr lange Fortsätze, welche in der Nähe der Längsmuskelzellen am dichtesten sind. Aufgrund ihrer Anordnung und Ultrastruktur wird eine regulatorische Funktion am Längsmuskel vermutet (RUMESSEN et al. 2013).

ICC-SEP liegen in Septen zwischen Bündeln glatter Muskelzellen, während ICC-IM mit den glatten Muskelzellen vermischt sind. ICC-IMs in Magen und Dünndarm übermitteln Informationen von den enterischen Motoneuronen (BURNS et al. 1996). Sie haben aber auch Schrittmacheraktivität und können Frequenzänderungen der Slow waves bei nervalen Input oder Dehnung einleiten (SANDERS et al. 1999, WARD et al. 2000b, SANDERS et al. 2006, SCHNEIDER et al. 2019). Die Projektionen der ICC-SEP bieten einen aktiven Ausbreitungsweg für Slow waves über sehr kurze Entfernungen (< 2mm) hinaus, wodurch diese sich auch bei Tieren mit dickeren Muskelschichten ausbreiten können (SANDERS et al. 1990, BLAIR et al. 2012).

### **2.3.2 Gastrointestinale Hormone**

Bisher sind ca. 30 gastrointestinale Hormone bekannt (FUKUI et al. 2018). Sie werden von enteroendokrinen Zellen freigesetzt, die entlang des gesamten GIT verteilt sind und weniger als ein Prozent aller Epithelzellen des GITs ausmachen (FUKUI et al. 2018). Gastrointestinale Hormone spielen sowohl interdigestiv (beispielsweise Motilin und Ghrelin) als auch postprandial (Cholecystokinin (CCK), Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), Peptid YY (PYY), Serotonin) eine wichtige Rolle (FUKUI et al. 2018).

Gastrointestinale Hormone beschränken sich in ihrer Wirkung häufig auf lokal begrenzte Bereiche. Beispielsweise verzögert Gastrin, welches von endokrinen Zellen des Magens gebildet wird, die Magenentleerung (OLSSON und HOLMGREN 2001). Im Gegensatz dazu beschleunigen Motilin und CCK die MMCs und bewegen die Muskulatur der Gallenblase zur Kontraktion. Ghrelin wird im Magen gebildet und stimuliert zentral den Appetit und die Nahrungsaufnahme sowie lokal die Magenmotilität und die Sekretion von Gallensäure (MASUDA et al. 2000, MÜLLER et al. 2015, TACK et al. 2006).

GLP-1 und PYY werden von L-Zellen in Ileum und Colon gebildet (HOLST 2007, SPRECKLEY und MURPHY 2015). GLP-1 führt, stimuliert durch das Vorhandensein von Nährstoffen, zur Insulin-Sekretion (HOLST 2007). Postprandial verlangsamt es die Magenentleerung und die intestinale Motilität (MARATHE et al. 2011). PYY hemmt den Appetit, verlangsamt die Motilität im Dünndarm und verzögert den Weitertransport im Colon (SANGER und LEE 2008, TOUGH et al. 2011). Außerdem wurden Serotonin (5-HT) und Somatostatin im Colon nachgewiesen (MARTINS et al. 2017). Über 90 % des Serotonins werden im Darm von Enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen) gebildet und vor der Freisetzung in sekretorischen Granula gespeichert (GERSHON 2013). Das in den EC-Zellen produzierte Serotonin ist bedeutend für die propulsive Motilität, die Formierung des Darminhalts, die Sekretion und Vasodilatation. Weiterhin ist Serotonin ein trophischer Wachstumsfaktor und ein Entzündungsmediator und ist bei der Wahrnehmung von Schmerz oder Übelkeit beteiligt (MAWE und HOFFMAN 2013, GERSHON und TACK 2007, HEREDIA et al. 2013). Deutlich weniger Serotonin als in den EC-Zellen wird im myenterischen Plexus produziert (WALTHER et al. 2003). Neurone, welche Serotonin enthalten, machen zwar nur 2 % der myenterischen Neurone im Darm aus, haben aber viele und weitläufige Projektionen (OKAMOTO et al. 2014). Besonders wichtig für die Darmmotilität sind dabei die Projektionen zu anderen serotinerger Neuronen, die zu NOS-enhaltenden Neuronen, und die zu den ICCs (KENDIG und GRIDER 2015). Serotonin beeinflusst die MMCs im Colon und vermindert die Frequenz der LDCs (rhythmic long distance contractions) (YU et al. 2015, CHEN et al. 2013). Eine weitere Funktion von Serotonin ist die Unterstützung der Vasodilatation und Aktivierung der Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion (SCHNEIDER et al. 2019).

Die gastrointestinalen Hormone beeinflussen nicht nur die Darmmotilität, sondern auch den Appetit und den Energiemetabolismus des Körpers (FUKUI et al. 2018). Über die Darm-Hirn-Achse (Gut-brain axis) kann die Freisetzung von Neurotransmittern im Hypothalamus und Hirnstamm beeinflusst werden (VINCENT et al. 2008). Die Regulation von Hunger und Sättigung hat wiederum einen Einfluss auf die Gewichtsregulation und die Entstehung von Übergewicht (VINCENT et al. 2008, MURPHY und BLOOM 2006). Gastrointestinale Hormone wirken auch exokrin und regulieren die Sekretionsmechanismen im MDT (MURPHY und BLOOM 2006, PEETERS 2015). GIP und Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) erhöhen die Insulin-Freisetzung, können in höheren Konzentrationen aber auch die gastrointestinale Motilität hemmen (PEETERS 2015).

### 2.3.3 Enterisches Nervensystem (ENS)

Die intrinsischen, in der Magen-Darm-Wand lokalisierten Nervenzellen werden in ihrer Gesamtheit als enterisches Nervensystem (ENS) bezeichnet (PFANNKUCHE und SCHEMANN 2015). Dieses ist ein Teil des autonomen Nervensystems und steuert und koordiniert Verdauungsvorgänge wie die Motilität der Darmmuskulatur, die epitheliale Resorption von Nährstoffen, die Sekretion von Enzymen und Ausscheidungsprodukten, sowie den intramuralen Blutfluss und die Abwehr von körperfremden Agentien (COSTA et al. 1992a, COSTA und FURNESS 1976, FURNESS et al. 1996, GRUNDY und SCHEMANN 2006, OLSSON und HOLMGREN 2001, WOOD 1994, WOOD 2006).

Das ENS verfügt über eine Reihe spezieller fest installierter Programme (neuronaler Reflexschaltkreise), die infolge eines Stimulus ablaufen und koordiniert bestimmte Effektoren aktivieren. Die große Anzahl und funktionelle Spezialisierung der enterischen Neurone befähigt diese, die elementare Regulation gastrointestinaler Funktionen autonom durchzuführen. Darum soll das enterische Nervensystem als zentrales intrinsisches Element in der Steuerung der Darmmotilität im Anschluss näher beschrieben werden.

#### 2.3.3.1 Aufbau ENS

Das ENS stellt einen eigenständigen Teil des vegetativen Nervensystems dar. Die namentliche Abgrenzung dieses Begriffes erfolgte, um die funktionelle Bedeutung sowie die Eigenständigkeit dieses Nervenplexus vom sympathischen und parasympathischen Nervensystem hervorzuheben (LANGLEY 1921). Das ENS wird auch als „little brain of the gut“ bezeichnet, da seine enorme Anzahl an Neuronen, beim Menschen etwa hundert Millionen Nervenzellen, mit der Gesamtzahl der Neurone im Rückenmark vergleichbar ist (GRUNDY und SCHEMANN 2006, WOOD et al. 1999, SURPRENANT 1994).

Das enterische Nervensystem besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen. Der *Plexus myentericus* nach seinem Entdecker auch Auerbach Plexus genannt, befindet sich zwischen der Längs- und Zirkulärmuskelschicht der *Tunica muscularis* (AUERBACH 1862). Der zweite Plexus ist der *Plexus submucosus*, nach seinem Erstbeschreiber auch als Meissner Plexus bezeichnet, der mehr lumenorientiert in der *Tela submucosa* liegt (SALOMON 2020). Beide Plexus bestehen aus Ganglien und interganglionärer Nervensträngen. Die Ganglien enthalten die Somata der Neurone des jeweiligen Plexus (GRUNDY und SCHEMANN 2006). Die Anzahl der Somata variieren zwischen verschiedenen Spezies und Darmabschnitten (GABELLA 1987). Im myenterischen Plexus adulter Schweine enthält ein Ganglion zwischen 20 und 60 Nervenzellen (SRI PARAN et al. 2008).

Die Aufgabe des *Plexus myentericus* besteht in der Kontrolle der Aktivität von Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur. Der *Plexus submucosus* übernimmt die Steuerung verschiedener Mucosafunktionen, beispielsweise Sekretion, Resorption und des lokalen Blutflusses (SCHEMANN 2000, SCHNEIDER et al. 2019). Beide Plexus werden sowohl von enteroendokrinen Zellen, als auch durch das autonome Nervensystem beeinflusst. Darüber hinaus interagieren sie mit Immun- und Epithelzellen (SCHNEIDER et al. 2019).

Der Plexus submucosus besteht bei großen Spezies wie Schwein und Mensch im Gegensatz zu dem der Nagetiere aus mehr als einer Schicht (BROOKES 2001, TIMMERMAN et al. 1997). Beim Schwein gibt es einen inneren submukösen Plexus (ISP) nah an der *Lamina muscularis mucosae* und einen äußeren submukösen Plexus (Outer submucous plexus, OSP) luminal der ZM (TIMMERMAN et al. 1997). Der OSP hat im porcinen Colon ein weiteres Netzwerk mit weniger Ganglien pro cm<sup>2</sup> und halb so vielen Neuronen pro Ganglion als der

ISP (PETTO et al. 2015). Die OSP Ganglien liegen in engem Kontakt zur ZM und es konnten Projektionen von diesen Ganglien zur ZM, aber nicht zur Mukosa, nachgewiesen werden. Darum geht man davon aus, dass diese Neurone in erster Linie die Motilität kontrollieren und weniger die Sekretion (PETTO et al. 2015). Im menschlichen Colon gibt es sogar noch einen dritten, intermediären Plexus zwischen ISP und OSP (HOYLE et al. 1989, WEDEL et al. 1999).

### 2.3.3.2 Enterische Neurone

Enterische Neurone können nach Morphologie, elektrophysiologischen Eigenschaften chemischer Kodierung und Funktion klassifiziert werden (FURNESS 2000, WOOD 1994, TIMMERMANN et al. 1997, GERSHON und TACK 2007).

**Morphologisch** können enterische Neurone in vier Gruppen eingeteilt werden (LOMAX et al. 1999). Die überwiegende Mehrheit stellen die zwei Typen „Dogiel Typ I“ und „Dogiel Typ II“ (DOGIEL 1899). Typ I-Neurone sind monoaxonal mit lamellaren Dendriten. Dogiel-Typ-II-Neurone sind mit oder ohne Dendriten multiaxonal. Neurone vom Typ I haben einen kleinen Innervationsbereich, während Neuronen vom Typ II aufgrund ihrer mehrachsigen Struktur einen größeren Innervationsbereich haben. Daher können Typ-II-Neuronen Informationen aus einem größeren Feld integrieren und somit das Effektor-Signal über ein breites Feld an Effektoren senden (DOGIEL 1899, LOMAX et al. 1999). „Filamentous ascending interneurons“ und „Small filamentous neurons“ als dritte und vierte Gruppe, projizieren lokal zur LM und ZM (LOMAX et al. 1999).

Nach **elektrophysiologischen** Merkmalen werden enterische Neurone als S-Typ I und AH Typ II klassifiziert. Beide Arten von Neuronen erzeugen langsame erregende postsynaptische Potentiale (slowEPSPs) und schnelle EPSPs (fastEPSPs) (SARNA 2010). Ein schnelles EPSP dauert einige Millisekunden bis einige Sekunden (SARNA 2010). Es induziert normalerweise ein einzelnes Aktionspotential oder eine kurze Salve von Aktionspotentialen welche jeweils für kurze Zeit zur Freisetzung einer kleinen Menge an Neurotransmittern an den Axonterminalen führen (SARNA 2010). Im Gegensatz dazu dauert die Depolarisation während eines langsamen EPSPs etwa 10 bis 60 Sekunden (CORNELISSEN et al. 2001, PALMER et al. 1986). Folglich kann ein langsames EPSP eine lange Salve von APs induzieren, was zu einer nahezu kontinuierlichen Freisetzung von Neurotransmittern für die Dauer der Aktivierung führt. Das Ergebnis ist eine Akkumulation des Neurotransmitters am Neuro-Effektor-Übergang (SARNA 2010).

**Funktionell** werden enterische Neurone in Motoneurone, Interneurone und intrinsische sensorische Neurone unterteilt.

**Motoneurone** projizieren als erregende (exzitatorische) oder hemmende (inhibitorische) Motoneurone aus dem *Plexus myentericus* an die Darmmuskulatur. Sie sind monoaxonale Neurone vom Dogiel-Typ I (SARNA 2010). Durch retrograde Färbe-Techniken enterischer Nervenzellen mit dem Farbstoff Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der exzitatorischen (Cholin – Acetyltransferase (ChAT) -positiven) Motoneurone in orale Richtung projiziert und die der hemmenden (neuronal Stickoxid Synthase (nNOS) - positiv) in anale Richtung (PORTER et al. 1997, SARNA 2010).

**Interneurone** im Dickdarm sind ebenfalls größtenteils vom Dogiel Typ I (PORTER et al. 1997). Sie projizieren über mehr als 10 mm in orale, anale und zirkumferentielle Richtung, um Signale zwischen benachbarten Ganglien zu übertragen (LOMAX et al. 1999). Die absteigenden Projektionen der Interneurone übersteigen



die aufsteigenden Projektionen im Verhältnis 4:1 (LOMAX et. al. 1999). Interneurone können sowohl mit erregenden, als auch hemmenden Motoneuronen in den Zielganglien in Kontakt sein, um die Freisetzung ihrer jeweiligen Neurotransmitter zu stimulieren. Sie können aber auch mit anderen Interneuronen kommunizieren, wodurch die Signale über größere Entfernungen transportiert werden. Ungefähr 90 % der oral projizierenden (aszendierenden) Interneurone und ungefähr 50 % der in anale Richtung projizierenden (deszendierenden) Interneurone enthalten ChAT allein oder ChAT mit nNOS. In beiden Fällen sind die cholinergen (ChAT-positiven) Interneurone über nikotinerge Rezeptoren verschaltet. Folglich blockiert der nikotinerge Antagonist (SARNA 2010) Hexamethonium die Übertragung in orale oder anale Richtung sowie die Stimulation von Motoneuronen in zirkumferentieller Richtung (GRIDER 1989, FRANTZIDES et. al. 1987, SARNA et. al. 1981). Die cholinergen Interneurone, welche mit hemmenden Motoneuronen verschaltet sind, bewirken eine Hemmung von Kontraktionen, und diejenigen, die mit cholinergen exzitatorischen Motoneuronen verschaltet sind, bewirken eine Stimulation von Kontraktionen. Eine geringe Anzahl deszendierender Interneurone im Dickdarm ist auch immunreaktiv für (vasoaktives intestinales Peptid) VIP, Tachykinine, 5-HT, Neuropeptid Y, Galanin, Somatostatin und Met-Enkephalin (WATTCHOW et. al. 1997, NICHOLS et. al. 1994, BURLEIGH et. al. 1990, WARDELL et. al. 1994). Die genauen Rollen dieser Neurotransmitter, wie auch von NO in Interneuronen, sind derzeit jedoch noch weitestgehend unbekannt.

Die Zellkörper von **intrinsic sensorischen Neuronen** (ISNs) befinden sich in submukosalen und myenterischen Ganglien. Die axonale Enden dieser Neuronenpopulation projizieren in die Mukosa, die Muscularis und die *Muscularis submucosae*. Sie detektieren das Vorhandensein von Digesta und deren chemische Zusammensetzung, sowie die Wandspannung der Darmwand infolge einer Kontraktion oder Dehnung (LOMAX et. al. 2000, NEUNLIST et. al. 1999, KUNZE et. al. 1999, PAN und GERSHON 2000, WOOD 2008). ISNs übertragen die sensorische Information direkt an die benachbarten Motoneuronen oder indirekt über eine Kette von Interneuronen an Motoneurone von Ganglien, die sich oral oder aboral der ISNs befinden. Die meisten ISNs sind vom multiaxonalen Dogiel Typ II und AH Typ (LOMAX et. al. 1999, WADE und WOOD 1988 (a) und (b), MESSENGER et. al. 1994, NURGALI et. al. 2003, BROOKES et. al. 1987). Im Dünndarm des Meerschweinchens rufen Schleimhautstimuli sowohl schnelle, als auch langsame EPSPs in postsynaptischen Neuronen hervor (PAN und GERSHON 2000). Tetrodotoxin, Hexamethonium,  $\omega$ -Conotoxin und niedriges  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. hohes  $\text{Mg}^{2+}$  im Medium blockieren die schnellen EPSPs, was bedeutet, dass ihre Erzeugung eine neuronale Leitung und mindestens die Aktivierung nikotinerger Rezeptoren erfordert. Langsame EPSP in ISN können hingegen nicht durch den Nikotinrezeptor-Antagonisten Hexamethonium blockiert werden (SARNA 2010).

Neben dem ursprünglichen Begriff der intrinsic afferenten Neurone wurde in den letzten Jahren die Bezeichnung der **Mechanosensitiven Enterischen Neurone (MEN)** eingeführt und das Konzept einer exklusiven sensorischen Population im enterischen Nervensystem widerlegt. Vielmehr weiß man mittlerweile, dass eine Vielzahl enterischer Neurone mechanische Stimuli rezipieren kann, daneben aber auch andere Funktionen innerhalb des ENS hat. Bei den MEN können Rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN), Slowly adapting mechanosensitive enteric neurons (SAMEN) und Ultra-slowly adapting mechanosensitive enteric neurons (USAMEN) unterschieden werden (MAZZUOLI-WEBER und SCHEMANN 2015, KUGLER et al. 2015). Die Einteilung erfolgt danach, wie schnell die Neurone nach einer Deformation reagieren und APs auslösen. Bei RAMEN erfolgt das innerhalb von 500 ms, bei SAMEN auch darüber hinaus, aber mit sinkender Frequenz, und bei USAMEN bleiben die APs auch nach 500 ms in

gleichbleibender Frequenz (MAZZUOLI-WEBER und SCHEMANN 2015, MAZZUOLI und SCHEMANN 2009, MAZZUOLI und SCHEMANN 2012).

MEN haben sowohl Fortsätze mit mechanosensitiver als auch mit efferenter Funktion (MAZZUOLI-WEBER und SCHEMANN 2015). Sie reagieren vor allem auf Kompression (RAMEN, SAMEN und USAMEN) und/oder Dehnung (dehnungsempfindliche USAMEN) und weniger auf Scherkräfte (MAZZUOLI-WEBER und SCHEMANN 2015, KUGLER et al. 2018).

Die Regulation der Darmmotilität am Effektor Muskulatur durch das ENS erfolgt letztlich über die Ausschüttung verschiedener **Neurotransmitter**. Motorneurone können infolge ihrer Aktivierung erregende oder hemmende Neurotransmitter ausschütten, wodurch eine Hemmung oder Erregung des entsprechenden Effektors erzielt werden kann. Es gibt über 20 verschiedene Neurotransmitter, die im Einzelnen hemmend oder erregend auf einen Effektor wirken können. Einige Neurotransmitter können auch gleichzeitig für einen Effektor hemmend und für einen anderen erregend wirken (NEUNLIST et. al. 1999).

Die wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im ENS sind Acetylcholin (AC), Neurokinin A (NKA) und Substanz P. Die synaptische Übertragung von AC vermitteln im ENS zwei Arten von Rezeptoren, muscarinerge und nicotinerge AC-Rezeptoren (HARRINGTON 2010). Die Bedeutung von muscarinergen AC-Rezeptoren für die Bestimmung der vielfältigen Rollen, welche AC in der Darmphysiologie einnimmt, spiegelt sich in den unterschiedlichen Subtypen und deren unterschiedlichen Verteilung wieder, welche wiederum an unterschiedliche G-Proteine koppeln, wodurch nach Aktivierung variable intrazelluläre Relationen hervorgerufen werden (HARRINGTON 2010). Die AC Bindung an muscarinerge AC Rezeptoren kann eine Zelle depolarisieren, was zu einer Initiierung eines anderen AP führen kann, oder die AC Bindung hyperpolarisiert eine Zelle, wodurch zusätzliche Aktionspotentiale gehemmt werden (HARRINGTON 2010). Es gibt fünf muscarinerge AC Rezeptor-Subtypen ( $M_{1-5}$ ), wobei  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  die Phosphoinositol-Kaskade stimulieren, während  $M_2$  und  $M_4$  eine Hemmung der Adenylcyclase vermitteln (HARRINGTON 2010). Das Wissen über die Lokalisierung und damit den Einfluss muskarinerg AC Rezeptoren auf die Vermittlung der cholinergen Übertragung innerhalb der neuronalen Schaltkreise ist fragmentiert (HARRINGTON 2010). Immunhistochemische Studien zur Lokalisierung muscarinerg AC Rezeptoren zeigen eine Verteilung von  $M_1$ ,  $M_2$  und  $M_3$  Rezeptoren auf Muskelschichten, myenterischen und submucosalen Ganglien, Nervenfasern in der ZM, innerhalb von Ganglien auf Schleimhautzellen und auf submucosalen Blutgefäßen (HARRINGTON 2010). Die Expression von  $M_4$  und  $M_5$  AC Rezeptoren konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden, es bestehen allerdings Hinweise auf deren Vorhandensein innerhalb des ENS (HARRINGTON 2010). Die AC Bindung an nicotinerge Rezeptoren aktiviert enterische sensorische Neurone und Interneurone, sie vermittelt schnelle Neurotransmissionen und ist der vorherrschende Mechanismus für die cholinerge Neurotransmission in enterisch aufsteigenden Reflexwegen (HARRINGTON 2010; PFANNKUCHE und SCHEMANN 2015). Nicotinerge AC Rezeptoren spielen auch eine Rolle bei der Vermittlung der cholinergen Übertragung innerhalb absteigender Hemmreflexe, diese ist jedoch untergeordnet (HARRINGTON 2010).

AC kann schnelle synaptische Vorgänge, die hauptsächlich erregend sind, auslösen (erregende postsynaptische Potentiale, fast EPSPs), aber auch erregende, langsame synaptische Potentiale (slow EPSPs). Fast EPSPs sind Folge einer AC-Wirkung auf postsynaptische cholinerge, nikotinerge Rezeptoren (SCHEMANN 1990) und können durch Hexamethonium als nikotinerger Rezeptor-Antagonist verhindert werden (LOMAX et al. 2007). Bei Slow EPSPs erfolgt die AC-Wirkung hingegen über muskarinerge Rezeptoren (SCHEMANN 1990). Durch slow EPSPs kommt es zu einer enormen Aktivitätssteigerung der Neurone. Dabei halten, unter

anderem durch die Aktivierung des cAMP-abhängigen Second-Messenger-Systems, die synaptischen Vorgänge nach der Neurotransmitter-Ausschüttung für mehrere Sekunden bis zu Minuten an (SCHEMANN 1990). Außer AC sind daran auch Amine und Peptide als Neurotransmitter beteiligt (SCHEMANN 1990). Beide EPSPs werden weitergeleitet zu Zellen vom Dogiel Typ I und II sowie zu „filamentous ascending interneurons“ und „small filamentous neurons“ (LOMAX et al. 1999).

Als hemmende Neurotransmitter der Muskel-Neurone sind Stickstoffmonoxid (NO), Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Adenosintriphosphat (ATP) zu nennen, bei deren Ausschüttung eine Relaxation des Darmes erfolgt. Als wichtigster hemmender Neurotransmitter ist NO hervorzuheben. NO wird in inhibitorischen enterischen Neuronen durch drei Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet (PALMER et al. 1988, MONCADA et al. 1991, MONCADA und HIGGS 1993). Es kann aber beispielsweise auch im Lumen des Magens (BENJAMIN et al. 1994) und im ischämischen Herzen (ZWEIER et al. 1995) aus Nitrit ohne Beteiligung einer NOS gebildet werden. Im Darmlumen kann Nitrat ohne Beteiligung einer NOS von Darmbakterien zu NO umgebaut werden (TISO und SCHECHTER 2015).

NO ist der wichtigste Transmitter der hemmenden, deszendierenden Muskelmotoneuronen und wirkt sowohl auf die glatte Muskulatur als auch auf ICCs (KLEIN et al. 2013, LIES et al. 2014, PFANNKUCHE und SCHEMANN 2015). Des Weiteren spielt NO eine bedeutsame Rolle bei der Regulation des gastrointestinalen Blutflusses (PIQUE et al. 1989) und steigert im Colon die Sekretion von Chlorid und Wasser (PFANNKUCHE et al. 2012, GÄBEL et al. 2003). Die Wirkung erfolgt primär durch Modulation der NO-sensitive Guanylylcyclase (GC-NO). Diese wird durch Bindung von NO aktiviert (SARNA und SHI 2006). In Folge wird Guanosintriphosphat (GTP) von der GC in cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt. Dieses aktiviert die c-GMP-abhängige Proteinkinase 1 (PRKG1), was die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen an intrazellulären Proteinen zur Folge hat (SCHNEIDER et al. 2019). Über noch nicht vollständig entschlüsselte Mechanismen erfolgt dann die Hyperpolarisierung der glatten Muskelzellen (KLEIN et al. 2013, LIES et al. 2014, SCHNEIDER et al. 2019). Abhängig von der Darmregion kann die Regulation von ICCs, glatten Muskelzellen und PDGFR $\alpha$ -Zellen durch NO variieren. Nicht nur die Lokalisierung der ICCs, sondern auch die Rezeptorexpression unterscheiden sich in verschiedenen Darmregionen (IINO et al. 2008, SCHNEIDER et al. 2019). So wird beispielsweise die NO-sensitive Guanylylcyclase (NO-GC) Untereinheit sGC $\beta$ 1 nicht von ICC-MY in Magen und Dünndarm exprimiert, von ICC-MYs im Colon aber in großem Maße (IINO et al. 2008).

Im myenterischen Plexus und im OSP des porcinen Colons sind NOS-haltige Neurone in hoher Anzahl vorhanden (BARBIERS et al. 1993). Diese projizieren im myenterischen Plexus in analer Richtung (BARBIERS et al. 1995). Während in der ZM reichlich NOS-positive Neurone nachweisbar sind, sind sie in der LM nur spärlich vorhanden (BARBIERS et al. 1993). Inhibitorische enterische Neurone setzen neben NO auch die Neuropeptide VIP und Hypophysen-Adenylat-Cyclase-aktivierendes Polypeptid (PACAP) frei (SANDERS et al. 2012). Beide Transmitter führen zur Aktivierung der Adenylatcyclase, zur Erzeugung von cAMP und zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (SANDERS et al. 2012). Dabei werden durch Aktivierung von Kalium-Kanälen und Verringerung der Calcium-Sensitivität des kontraktile Apparates die Erregbarkeit und Kontraktion reduziert (SANDERS et al. 2012). Neuropeptide werden vor allem bei hohen Aktionspotentialfrequenzen freigesetzt dieser Vorgang spielt bei der direkten motorischen Neurotransmission nur eine geringe Rolle (SANDERS et al. 2012).

Die NOS-positiven Neurone haben je nach Funktion unterschiedliche Projektionslängen. In der ZM des menschlichen Colons projizieren 77 % der NOS-positiven Neurone bis zu 19 mm in Richtung anal, die übrigen

23 % maximal 6 mm in orale Richtung (PORTER et al. 1997). Myenterische Motoneurone vom Dogiel Typ 1 im menschlichen Darm haben Projektionen von bis zu 16 mm, während Interneurone dieses Typs bis zu 68 mm aboral und 38 mm oral projizieren (WATTCHOW et al. 1995). Die Projektionslängen der inneren und äußeren Motoneuronen in Pansen und Haube von neugeborenen Schaflämmern lagen im Mittelwert zwischen 3,6 und 5,9 mm (PFANNKUCHE et al. 2004). Im porcinen Darm variierten die nitrergen Neurone in Größe und Form (BARBIERS et al. 1993, TIMMERMANS et al. 1994). Die meisten myenterischen, nitrergen Neurone projizierten auch hier in anale Richtung. Ein wesentlicher Anteil dieser Neurone war an der dichten nitrergen Innervation des tertiären Plexus und der ZM beteiligt (TIMMERMANS et al. 1994).

### 2.3.3.3 Reflexschaltkreise

Die Kontrolle und Koordination der verschiedenen Aktivitäten des gesamten Gastrointestinaltraktes wird durch die sensorischen Neurone, Interneurone und Motoneurone gewährleistet, die innerhalb verschiedener Reflexschaltkreise miteinander interagieren (PFANNKUCHE und SCHEMANN 2015). Aktiviert werden diese Reflexschaltkreise durch mechanische oder chemische Stimuli, welche durch intrinsisch primär afferente Neurone (IPANs) erfasst werden. Die aktivierten IPANs aktivieren wiederum Interneurone. Diese bilden Reflexketten, die sowohl oral (aszendierend) als auch aboral (deszendierend) verlaufen können. Interneurone beeinflussen somit die Polarität des peristaltischen Reflexes. Sie aktivieren oral die exzitatorischen Motoneurone, was zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur führt, und sie aktivieren aboral die hemmenden Motoneurone, was zu einer Entspannung der glatten Muskulatur führt und den Transport eines Bolus in anale Richtung ermöglicht (KUNZE und FURNESS 1999, BORNSTEIN et al. 2004, HANSEN 2003).

Neben den IPANs sind an diesen Reflexen auch MEN beteiligt. RAMEN reagieren direkt auf eine Deformation der Ganglien und deshalb auch bei einer Muskelparalyse oder bei einer Blockade der Übertragung durch Synapsen. Im Gegensatz zu IPAN erhalten RAMEN schnelle EPSPs und lösen APs nur bei einer dynamischen Änderung, aber nicht weiter bei anhaltender Deformation aus (MAZZUOLI und SCHEMANN 2009).

Motoneurone sind die Verbindung zwischen den Interneuronen und den glatten Muskelzellen der ZM und LM. Abhängig davon, welche NTs von ihnen exprimiert werden, können sie in exzitatorische und inhibitorische Motoneurone eingeteilt werden (FURNESS 2000). Erregende Motoneurone setzen u.a. AC und Tachykinine (NKA und Substanz P) frei, die eine Kontraktion der glatten Muskulatur auslösen. Im Gegensatz dazu setzen hemmende Motoneuronen NO und ATP, aber auch VIP, PACAP, CO und Schwefelwasserstoff frei, die relaxierend auf glatte Muskelzellen wirken (LECCI et al. 2002, LINDEN et al. 2010). Charakteristisch für Motoneurone sind ihre polarisierten Projektionen. Cholinerge, exzitatorische Neurone projizieren in orale, nitrerge hemmende Neurone in anale Richtung (PORTER et al. 1997, SARNA 2010).

Unter den verschiedenen enterischen Reflexen hat der „peristaltische Reflex“ die größte Aufmerksamkeit erhalten. BAYLISS und STARLING (1899) stellten diesen Reflex erstmals im Dünndarm von Hunden fest. Im Rahmen des peristaltischen Reflexes wird die ZM und LM des Darmes sequentiell durch erregende und hemmende Motoneurone aktiviert bzw. inaktiviert. Zur Passage von Darminhalt kontrahiert die ZM oral, während sie aboral erschlafft. Die LM verhält sich entgegengesetzt: orale Relaxation bei aboraler Kontraktion. Dadurch erweitert sich das aborale Segment und kann den Bolus aufnehmen (SCHEMANN 1990). BAYLISS und STARLING (1899) proklamierten den peristaltischen Reflex mit aufsteigender Kontraktion und absteigender Hemmung als Grundlage für den Vortrieb im Darm („Gesetz des Darmes“) (SARNA 2010). Diese Verschaltung wiederholt sich immer wieder entlang des Darmes. Den peristaltischen Reflex und weitere

intrinsische Programme ablaufen zu lassen, ist eine der wesentlichen Funktionen des ENS (SCHEMANN 1990). Einige Forscher in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnten jedoch die Ergebnisse von BAYLISS und STARLING (1899) nicht reproduzieren und haben das „Gesetz des Darms“ in Frage gestellt (EZ 1919, ALVAREZ 1948, WHITE et. al. 1934, RODEN 1937). Die Überlegung war: Wenn der Vortrieb im Darm durch stereotype Reflexe erfolgen sollte, müsste die Digesta über die gesamte Länge des Magendarmtraktes mit derselben Geschwindigkeit vorangetrieben werden, was jedoch nicht der Fall ist (SARNA 2010). Mehrere Jahrzehnte der Forschung zu diesem Thema mit elektrophysiologischen, immunhistochemischen sowie Organbad-Versuchen mit ex-vivo-Segmenten von Dick- oder Dünndarm, hauptsächlich von Nagetieren und Meerschweinchen, haben zu folgenden Erkenntnissen geführt (GRIDER 1993, GRIDER und JIN 1994, GRIDER 2003, GRIDER und MAKHLOUF 1986, WOOD 1988 (a),(b),(c), KADOWAKI et. al. 1996, GRIDER et. al. 2004, GRIDER et. al. 1996, COSTA und FURNESS 1976, BIAN et. al. 2004): (1) Eine fokale Stimulation der Schleimhaut oder zirkumferentielle Dehnung überträgt auf eine begrenzte Länge gleichzeitig ein erregendes Signal in orale und ein hemmendes in anale Richtung. (2) Diese Übertragung erfolgt über nikotinerge Kommunikation von Interneuronen. (3) Das Signal in oraler Richtung setzt bei geringeren Stimulationsintensitäten AC aus erregenden Motoneuronen frei und bei höheren Stimulationsintensitäten Substanz P. (4) Abhängig vom Setup, der Gewebepreparation und der Tierart erzeugen die exzitatorischen Neurotransmitter ein exzitatorisches Übergangspotential in den glatten Muskelzellen wodurch sich deren Tonus erhöht oder RPCs stimuliert werden (siehe 2.3.5). Die Intensität der mechanischen Reaktion hängt dabei von der Intensität des Stimulus ab (SARNA 2010). (5) Das Signal in aborale Richtung setzt NO und VIP im absteigenden Segment frei, wodurch ein inhibitorisches Übergangspotential in den glatten Muskelzellen erzeugt wird und sich deren Tonus erniedrigt. (6) Durch Reizung der Mukosa oder zirkumferentielle Dehnung wird 5-HT aus enterochromaffinen Zellen im betroffenen Bereich der Zirkulärmuskulatur freigesetzt. (7) 5-HT stimuliert 5-HT 1P bzw. 5-HT 4 -Rezeptoren an Nervenenden intrinsischer sensorischer Neurone in der Schleimhaut, wodurch CGRP (Calcitonin gene-related peptide) und oder AC freigesetzt wird, um gleichzeitig die oral und anal projizierten Interneurone in deren Einflussbereich zu stimulieren (KADOWAKI et. al. 1996, GRIDER et. al. 1996, GERSHON 2004). (8) Zusätzliche 5-HT 4 -Rezeptoren an ISN-Nervenenden können die Freisetzung von AC und CGRP aus den ISNs modulieren (PAN und GERSHON 2000). SARNA (2010) kommt zu dem Ergebnis, dass der peristaltische Reflex an sich noch keine Digesta antreibt. Der Vortrieb im Darm erfolgt nicht, indem an einer Stelle ein höherer Druck erzeugt wird, so wie im Herz-Kreislauf-System. Der Antrieb erfolgt vielmehr durch die räumliche und zeitliche Ausbreitung von Kontraktionen, an denen slow waves, elektromechanische sowie pharmakomechanische Kopplungen beteiligt sein müssen (SARNA 2010). Welche Rolle die Längsmuskulatur im Ablauf der Darmperistaltik spielt ist noch nicht vollständig erforscht (SCHEMANN 2014). Wenigstens im Dünndarm scheint es so zu sein, dass die LM im Ablauf des peristaltischen Reflexes durch die Kontraktion der ZM gedehnt und bei Erschlaffung dieser gestaucht wird, wodurch der Eindruck entsteht, dass die LM der ZM passiv folgt (SCHEMANN 2014).

Ein großer Teil unseres Verständnisses der neuronalen Reflexe und Schaltkreise stammt aus Untersuchungen am Meerschweinchen. Die Interpretation der Ergebnisse aus dieser Spezies für die Darmmotorik bei anderen Spezies, insbesondere beim Menschen, ist jedoch nicht uneingeschränkt möglich. Das Meerschweinchen erzeugt beispielsweise nicht wie andere Spezies ständig slow waves im Darm (KURIYAMA et. al. 1967, DONNELLY et. al. 2001). Der Vortrieb eines künstlichen Pellets in einem Ex-vivo-Dickdarmsegment von Mäusen und Meerschweinchen wird häufig als Beweis für den Vortrieb durch aufsteigende Erregung und absteigende Hemmung angeführt (KADOWAKI et. al. 1996, JIN et. al. 1999). Ein solcher Antrieb tritt jedoch nicht in Ex-vivo-Segmenten höherer Spezies, einschließlich Hunden und Menschen, auf. Dieser Antrieb ist bei

Mäusen und Meerschweinchen einzigartig, da diese in in-vitro Experimenten GMCs (Giant migrating contractions) erzeugen können (FIDA et. al. 1997, GONZALEZ et. al 2001a,b).

Intrinsisch können enterische Schaltkreise an und abgeschaltet werden, zum Beispiel durch eine Entzündung. Wenn inflammatorische und/oder nekrotische Zellen Nukleotide in den extrazellulären Raum freisetzen, haben diese sowohl prä- als auch postsynaptisch eine Wirkung. Beispielsweise hemmen sie präsynaptisch die ATP-Freisetzung oder desensibilisieren postsynaptisch bestimmte Rezeptoren (IDZKO et al. 2014). Dies hat entscheidenden Einfluss auf die Darmmotilität (GALLEGO et al. 2006, GALLEGO et al. 2016, GALLEGO et al. 2014, XUE et al. 1999).

#### **2.3.4 Extrinsische Steuerung**

Die extrinsische Innervation der Darmmotilität erfolgt durch Nervenzellen außerhalb der Wand des Magen-Darm-Traktes und beinhaltet Teile des zentralen Nervensystems (ZNS), des Sympathikus und des Parasympathikus als Teile des autonomen Nervensystems und der viszerale Afferenzen (Olsson und Holmgren 2001). Extrinsische Nerven koordinieren verschiedene Darmbereiche, initiieren und modulieren die intrinsischen Mechanismen und vermitteln Verschaltungen zu „langen Reflexen“, oder auch zu Reflexschaltkreisen im ZNS.

Die extrinsische Innervation des Dickdarms erfolgt über sympathische Neurone, die in den prävertebralen und in geringerem Ausmaß in paravertebralen Ganglien lokalisiert sind und hauptsächlich über die Kolonnerven, aber auch über rektale Nerven in die Darmwand projizieren (MESSENGER et al. 1994, TRUDRUNG et al. 1994). Parasympathische efferente Nervenzellkörper im Hirnstamm innervieren das *Colon ascendens* über den *Nervus vagus* (HOLST et al. 1997).

Die vegetativen Afferenzen verlaufen mit dem *Nervus vagus* oder dem Nervus splanchnicus. Über sie werden aus dem Darm Informationen zur Nährstoffkonzentration, dem pH-Wert im Darmlumen, zur Osmolarität und zur Wandspannung des Darmes an das ZNS weitergeleitet. Gemeinsam mit den sensorischen, intestinofugalen Neuronen registrieren sie mechanische Reize, beispielsweise zum Füllungszustand des Darmes und sind wichtig für die Koordination verschiedener Darmabschnitte (PFANNKUCHE und SCHEMANN 2015).

#### **2.3.5 Motilitätsmuster im Colon verschiedener Tierarten**

Es gibt im Colon laut SARNA und SHI (2006) drei verschiedene Arten von Kontraktionen: Rhythmische phasische Kontraktionen (RPCs), riesige Migrationskontraktionen (GMCs) und tonische Kontraktionen (TCs). Abfolge und Häufigkeit, sowie das räumliche und zeitliche Auftreten dieser drei Kontraktionstypen unterscheidet sich tierartlich (SARNA 2010). Das Colon stellt das letzte Hauptorgan im Gastrointestinaltrakt dar und seine Motilität bzw. Motilitätsmuster haben großen Einfluss auf die Häufigkeit und den Zeitpunkt der Stuhlentleerung, sowie auf die Konsistenz und Form des Stuhls. Zum Beispiel haben Menschen und Hunde im Regelfall ein- bis zweimal am Tag Stuhlgang mit geformtem Kot. Hingegen haben Nagetiere, welche im Übrigen häufig in experimentellen Untersuchungen zum Einsatz kommen, deutlich häufiger Stuhlgang und scheiden den Kot in Form von festen Pellets aus. Folglich unterscheidet sich die Zusammensetzung, sowie das räumliche und zeitliche Auftreten der oben genannten drei Motilitätsmuster im Colon der verschiedenen Spezies (SARNA 2010).

**RPCs** dienen primär der Durchmischung des Darminhalts mit exokrinen, endokrinen und mukosalen Sekreten und weniger dem gerichteten Transport. Sie verschließen in der Regel das Darmlumen nicht vollständig. Durch die langsame Vorwärtsbewegung bleibt genug Zeit zur Verdauung und Absorption der Nährstoffe (SARNA 2006). Die Regulation des RPCs erfolgt durch slow waves. Wenn gleichzeitig mit einer Depolarisation bei einer slow wave von exzitatorischen, cholinergen Neuronen AC freigesetzt wird, bindet AC an muscarinerge-M<sub>3</sub>-Rezeptoren. Dies führt zu einer pharmakomechanischen Kopplung, der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und schließlich zu einer koordinierten Kontraktion glatter Muskelzellen (SARNA 2010). Eine weitere Möglichkeit der Regulation ist die Aktivierung inhibitorischer Motoneurone, welche NO und/oder VIP freisetzen und damit die Amplitude der RPCs beeinflussen können (SARNA 2010).

**GMCs** haben eine hohe Amplitude, verschließen das Darmlumen vollständig und bewegen sich schnell in distaler Richtung fort, um den Darminhalt weiter zu transportieren. Sie sind entscheidend für die Verweildauer der Ingesta im Darm und die Kontaktzeit mit der Mucosa zur Absorption von Wasser und Elektrolyten. Darum spielen sie eine wichtige Rolle beim Auftreten von Durchfall, Verstopfung und viszerale Schmerzen (BASSOTTI et al. 2004, BAZZOCCHI et al. 1990, CHEY et al. 2001, CLEMENS et al. 2003, COOK et al. 2000, KARAUS und SARNA 1987, SARNA und SHI 2006). In Folge der Kompression der Darmwand durch GMCs werden wiederum sensorische Rezeptoren aktiviert, die deszendierend zu einer Hemmung von spontan auftretenden RPCs und damit zur Relaxation der Muskulatur führen (BASSOTTI et al. 2004, CHEY et al. 2001, OTTERSON und SARNA 1994). Dies erleichtert die Vorwärtsbewegung des Ingesta. Bei Menschen und den meisten Nagern treten GMCs spontan im Dünndarm und im Dickdarm auf (SARNA et al. 2010). Die Regulation der GMCs sowie der TCs erfolgt nicht über slow waves, sondern über enterische Neurone, wodurch sie nicht dem Rhythmus der slow waves angepasst sind (SARNA 2010). Auch wenn die genauen Mechanismen für die Entstehung von GMCs nicht bekannt sind, weiß man, dass sie für ihre Ausbreitung intakte Interneurone benötigen. Zudem ist bekannt, dass langsame EPSPs, die eine lange Salve von Aktionspotentialen erzeugen, eine starke und anhaltende Freisetzung von AC hervorrufen und somit GMCs stimulieren (FRANTZIDES et al. 1987, KARAUS und SARNA 1987, SARNA 2006).

Die Regulation der **TCs** stellt sich anders dar als die der RPCs und GMCs, da TCs durch eine von AC aktivierte pharmakomechanische Kopplung entstehen (SARNA 2010). Die Dauer der tonischen Kontraktion hängt vom Volumen und dem Kaloriengehalt der Nahrung ab (FORD et al. 1995). Bei TCs wird an den Schließmuskeln (unterer Ösophagusphinkter und innerer Analsphinkter) sowie an Übergängen (Pylorus und Ileocaecalklappe) das Lumen teilweise oder vollständig verschlossen, um Reflux zu verhindern. Enterische inhibierende Neurone reduzieren diesen Tonus und ermöglichen den Durchtritt von lumenalem Inhalt in distaler Richtung (SARNA 2010). RPCs werden durch die TCs effektiver, da TCs das Darmlumen verengen und nun auch phasische Kontraktionen mit kleiner Amplitude das Darmlumen effektiv verschließen können (SARNA und SHI 2006).

SPENCER et al. (2016) unterscheiden ebenfalls drei verschiedene Motilitätsmuster. (1) Die von ihnen beschriebenen „ripples“ sind rhythmisch und treten in unterschiedlichen, von der Frequenz der slow waves abhängigen Frequenzen auf. Die Kontraktion ist oberflächlich (D'ANTONA et al. 2001, HUIZINGA et al. 2011, DINNING et al. 2012, COSTA et al. 2013). Damit entsprechen sie den oben beschriebenen RPCs. (2) Ein schnellerer Satz von Oszillationen wird durch Schrittmacherzellen in der Nähe des *Plexus myentericus* erzeugt. Sie können sich mit Slow waves mittlerer Frequenz addieren und sind wichtig für die Aktivität der LM (SMITH et al. 1987, SABOURIN et al. 1990). Damit haben sie ähnliche Charakteristika wie die GMCs. (3)

Ein drittes Bewegungsmuster kann nach der Blockade neuronaler Aktivität auftreten und ist Tetrodotoxin-resistent. In Abständen von einer oder mehr Minuten entstehen langsame, phasische Kontraktionen.

Bei Ratten und Mäusen wurden „Colonic migrating motor complexes (CMMCs)“, „pancolonic long distance contractions (LDCs)“ und „rhythmic propagating motor complexes (RPMCs)“ beschrieben (CHEN et al. 2013, FIDA et al. 1997, HUIZINGA et al. 2011, KENDIG und GRIDER 2015). LDCs und RDMCs sind zwei verschiedene Arten von CMMCs. Beide sind abhängig von ICCs. Während die LDCs sich über das ganze Colon ausbreiten, verlaufen die RPMCs nur vom mittleren zum distalen Colon (KENDIG und GRIDER 2015, CHEN et al. 2013). Die CMMCs wurden am detailliertesten bei Mäusen untersucht (FIDA et al. 1997, BRIERLEY et al. 2001, POWELL und BYWATER 2001, SPENCER und BYWATER 2002, ROBERTS et al. 2008, SPENCER et al. 2013), aber auch in vivo bei Kaninchen und Schafen (EHRLEIN et al. 1982, BEDRICH und EHRLEIN 2001), Hunden (SARNA 1986) sowie in vitro bei Meerschweinchen (COSTA und FURNESS 1976, D'ANTONA et al. 2001) und Kaninchen (LENTLE et al. 2008, DINNING et al. 2012). CMMCs entstehen neuronal im proximalen Colon, sind nicht von Darminhalt abhängig und können von Hexamethonium aufgehoben werden (KENDIG und GRIDER 2015, BARNES et al. 2014, LYSTER et al. 1995). Sie können oral oder aboral wandern oder in verschiedenen Bereichen des Colons simultan auftreten (SARNA et al. 1984). Sie verschließen das Lumen nicht vollständig und führen beim Kaninchen und Meerschweinchen zu Vertiefungen, die den Darminhalt zu Pellets formen (LENTLE et al. 2008, DINNING et al. 2012, COSTA et al. 2015).

Eine weitere Einteilung für die Motilitätsmuster beim Menschen erfolgte durch DINNING et al. (2014). Die Autoren fanden in vivo fünf verschiedene Motilitätsmuster beim Menschen: (1) ein zyklisches Motilitätsmuster entsprechend dem Rhythmus der slow waves, (2) kurze, einzelne Kontraktionssequenzen, (3) lange, einzelne Kontraktionssequenzen, (4) gelegentliche, retrograde, langsame Kontraktionssequenzen, (5) postprandial propagierende Sequenzen mit hoher Amplitude (HAPCs) (DINNING et al. 2014). Die kurzen und langen, einzelnen Kontraktionssequenzen traten in Intervallen von mehr als einer Minute auf. Diese Frequenz ähnelt der, die in vitro in Form von Kontraktionen mit niedriger Frequenz gesehen wurde. Die langen, einzelnen Kontraktionssequenzen zeigten eine signifikant längere Reichweite ( $40,8 \pm 8,4$  cm) als die kurzen, einzelnen Kontraktionsmuster (DINNING et al. 2014). Die HAPCs machen nur einen kleinen Prozentsatz aller beim gesunden Menschen beobachteten Motilitätsmuster aus (6-10 HAPCs in 24 Stunden) (BASSOTTI und GABURRI 1988, RAO et al. 2001, DE SCHRYVER et al. 2002).

### **2.3.6 Spezielle Motilitätsmuster im porcinen Colon**

Im Vergleich zu anderen Spezies ist die Colonmotorik des Schweines nur wenig untersucht worden. Insbesondere wurden für das porcine Colon peristaltische Wellen beschrieben, die mit einer höheren Frequenz (9-14 pro Stunde) ablaufen, als im Ileum (5-8 pro Stunde) (HIPPER und EHRLEIN 2001). Dadurch wird der Weitertransport des Nahrungsbreis, der aus dem Ileum in das Colon übertritt, sichergestellt (Hipper und Ehrlein 2001). Motilitätsmuster zur Durchmischung sind im Gegensatz zu denen für den aboralen Transport der Ingesta kaum untersucht worden. Dadurch bestehen für das Verständnis der lokalen Motilität und deren Regulation im porcinen Colon noch offene Fragen. HIPPER und EHRLEIN (2001) stellten fest, dass die Motilität der zentripetalen und der zentrifugalen Schleife des Colons aus frequenten Kontraktionen mit niedriger Amplitude und aus einzelnen peristaltischen Wellen besteht. Distal nehmen die peristaltischen Wellen in ihrer Kontraktionsstärke ab, wodurch der Chymustransport sich wesentlich verlangsamt. Zwischen den Kontraktionen lag ein Intervall von etwa 9 Sekunden, was zu maximal sechs Kontraktionen pro Minute führte. Peristaltische Wellen traten im Abstand von vier bis sieben Minuten auf. Dementsprechend lag die



Frequenz bei 9 – 14 pro Stunde. Diese Wellen begannen an der Grenze zwischen Caecum und Colon und setzten sich über die zentripetale und die zentrifugale Schleife fort.

McRORIE et al. (1998) stellten im proximalen Colon von Mini-Pigs täglich 27,9 kurz (7,8 Sekunden) andauernde, propagierende Kontraktionen mit niedriger Amplitude und 6,1 lang (19,2 Sekunden) andauernde, weniger schnell propagierende peristaltische Wellen mit höherer Amplitude fest. Auffallend und ein Unterschied zu anderen Spezies war, dass kein retrograder Transport der Ingesta beobachtet werden konnte (HIPPER und EHRLEIN 2001).

Wie aus den vorherigen Absätzen zu entnehmen ist, sind alle in vitro Studien zur Definition von Motilitätsmustern am porcinen Colon an Präparationen aus proximalen Abschnitten durchgeführt worden. Im Gegensatz dazu existiert keine vergleichbare Einteilung der Motilitätsmuster im distalen porcinen Colon.

## **2.4 Untersuchungen der Darmmotilität**

### **2.4.1 Untersuchungen in vivo**

Die Motilität des porcinen Colons wurde bisher nur in einigen wenigen in vivo Studien untersucht. Dabei bedienten sich die Autoren verschiedener methodischer Ansätze. Elektromyographische Aufzeichnungen (RUCKEBUSCH und FIORAMONTI 1980) wurden ebenso genutzt wie intraluminale Druckmessungen (CROWELL et al. 1992, McRORIE et al. 1998) und röntgenologische Untersuchungen (NEIMEIER 1939). Diese Techniken lieferten allerdings keine ausreichende Information über die Art und Weise und Funktion der intestinalen Kontraktionen. Außerdem waren sie sehr anfällig für Artefakte (HIPPER und EHRLEIN 2001).

Beim Menschen wurden in vivo Untersuchungen zur Colonmotilität mittels eines hochauflösenden Manometrikatheters durchgeführt (DINNING et al. 2014, LIN et al. 2017). Auch die Szintigraphie eignet sich zur nicht-invasiven Überprüfung der Darmmotilität (SOLNES et al. 2018). Schluckbare Sensorkapseln liefern vielfältige Informationen zu den einzelnen Darmabschnitten (KALANTAR-ZADEH et al. 2017).

Bei Hunden wurden von JEONG et al. (2018) in vivo Untersuchungen zu GMCs durchgeführt, indem in das Colon an drei verschiedenen Stellen Kraftaufnehmer implantiert wurden. Die Messungen erfolgten dann mit einem Telemetrie-Aufnahmesystem und Videokameras mit Infrarot-Nachtsicht.

Bei Mäusen wurde der Transit gemessen, indem eine Glas- oder Keramikugel mithilfe einer Pipette 2 cm proximal des Anus platziert wird. Anschließend wird die Zeit bis zur Ausscheidung dieser Kugel gemessen (FARZI et al. 2015, HE et al. 2019, DeWIRE et al. 2013, ZIELINSKA et al. 2016).

Alle oben genannten in vivo-Techniken bieten kaum Möglichkeiten, die Motilität von ZM und LM simultan zu erfassen. Zudem kann auch nicht mittels gezielter Elektrostimulation das ENS gereizt werden, um die Regulation der Motilität an ZM und LM zu untersuchen.

### **2.4.2 Untersuchungen in vitro**

Funktionelle in vitro Versuche wurden im Wesentlichen an einzelnen isolierten Gewebestücken in Organbädern oder an isolierten Einzelzellen durchgeführt. Nur wenige Studien haben die Darmmotilität von ZM und LM in einer Arbeit betrachtet und noch weniger haben die Darmmotilität von ZM und LM an einem Gewebepreparat simultan beschrieben. Dies lag vor allem, wie schon unter 2.4.1 erwähnt an nicht vorhandenen Untersuchungsmethoden. Die meisten Organbadsysteme erlauben nur eine eindimensionale

Betrachtung der Darmmotilität. Bei eindimensionalen Messungen wurden Untersuchungen zur Darmmotilität an einem einzelnen Darmmuskelstreifen durchgeführt. Diese Art der Motilitätsuntersuchung ist weit verbreitet und kommt bei Motilitätsmessungen an der gastrointestinalen Muskulatur in vitro standardmäßig zum Einsatz (GRAHAM und SNEDDON 1993; KÖHN 2000; PFANNKUCHE 2004; MÜNNICH 2009; BROAD et al. 2014; LEFEBVRE et al. 2017).

Die Studie von HUIZINGA et al. (1983) ist die einzige in vitro Untersuchung, welche Motilitätsmessungen am procinen Colon an isolierter ZM und LM in einer Studie durchführten. Die Autoren untersuchten die ZM und LM des procinen proximalen Colons getrennt voneinander im Organbad und fanden, dass Gewebeproben des Colons von frisch geschlachteten Schweinen die gleichen Ergebnisse bezüglich der Spontanaktivität liefern, wie die von anästhesierten Versuchsschweinen (HUIZINGA et al. 1983). HUIZINGA et al. (1983) leiteten sowohl mechanische Kräfte als auch die elektrische Aktivität an den isolierten zirkulär- und Längsmuskelstreifen ab und betrachteten Spontanmotilität unter Kontrollbedingungen sowie unter Hemmstoffeinfluss wie u.a. TTX, Atropin und mechanischer Dehnung.

Auch DENAC et al. (1990) untersuchten in vitro LM und ZM an Muskelstreifen gemeinsam in einer Studie. Diese stammten aus der Haubenrinne, der retikulo-omasalen Öffnung und dem *Canalis omasi* bei Kälbern und adulten Rindern und deren Motilität wurden getrennt voneinander beurteilt. Die Autoren charakterisierten den hemmenden Einfluss des Neuropeptids Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) im bovinen Vormagen.

BÄR et al. (2009) untersuchen in vitro an humaner ZM aus dem distalen Colon den Einfluss von *Escherichia coli* Nissel 1917 auf die Motilität. Auch hier erfolgte die Untersuchung der Darmmotilität nur an einem einzelnen Muskulaturstreifen (BÄR et al. 2009).

Die erste simultane Untersuchung an Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur erfolgte durch PFANNKUCHE (2004). Sie untersuchte die nerval vermittelte Muskelantwort im Pansen des Schafs und maß dabei mit zwei isometrischen Kraftaufnehmern zweidimensional an Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur. Nachdem selektiv intrinsische Nerven stimuliert wurden, kam es zu einer cholinerg vermittelten Kontraktion und einer nitroerg vermittelten Relaxation an ZM und LM (PFANNKUCHE 2004).

In meiner Diplomarbeit (OTTO 2006) habe ich ein Messsystem zur Charakterisierung enterischer Schaltkreise am porcinen Colon entwickelt. Dieses Messsystem ermöglicht es, basierend auf dem Einsatz isometrischer Miniatur-Kraftsensoren, Artefakt freie, unabhängige Motilitätsmessungen simultan an jeweils drei Positionen der Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur durchzuführen. Zudem bietet das Setup die Option einer selektiven elektrische Feldstimulation (EFS) enterischer Neurone an drei Positionen entlang der ZM, deren Wirkung lokal auf den Bereich der Stimulationselektrode begrenzt ist. Allerdings stand eine detaillierte Evaluierung des Messsystems bezüglich seiner Eignung zur Charakterisierung enterischer Schaltkreise noch aus. Dies war eines der Ziele der vorliegenden Arbeit.

Ein in Teilen vergleichbares Setup zur Motilitätsmessung wurde von ROHN (2009) für Messungen am Meerschweinchenmagen etabliert. ROHN (2009) untersuchte ebenfalls simultan an Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur die spontane und die nerval induzierte Muskelaktivität am isolierten Magen des Meerschweinchens mit vier isometrischen Kraftaufnehmern. Diese Kraftaufnehmer waren proximal, zentral und distal an der ZM platziert. Gleichzeitig erfolgte eine Messung über einen weiteren Kraftaufnehmer an der LM. Zur Charakterisierung aufsteigender und absteigender neuraler Projektionen führte ROHN

(2009) am proximalen, zentralen oder distalen Magenkorpus eine EFS durch. Dabei konnte er belegen, dass während der EFS oral des Stimulationsortes die elektrisch evozierten Kontraktionen immer höher waren als aboral des Stimulationsortes. Aboral der Stimulationsstelle kam es hingegen zu einer deutlicheren Relaxation als oral. Am höchsten waren die Amplituden der initialen Antworten bei lokaler Stimulation.

## **2.5 Bedeutung der Befunde für die vorliegende Arbeit**

Die Motilitätssteuerung im Colon ist sowohl aus veterinärmedizinischer als auch aus humanmedizinischer Sicht ein wichtiger Faktor zum Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie von Verdauungsprozessen. Wesentlich ist hierbei insbesondere die Interaktion zwischen funktionell unterschiedlichen Populationen enterischer Nervenzellen und der glatten Muskulatur der Colonwand.

Insbesondere bei kleinen Labornagern wurden verschiedene gastrointestinale Motilitätsmuster in vitro bereits beschrieben. Bei diesen Spezies gelang auch die funktionelle, elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung verschiedener, für die Steuerung der Motorik relevanter, Populationen enterischer Nervenzellen. Nichtsdestotrotz ist die Kontrolle von komplexen Motilitätsmustern durch enterische Nervenzellen bisher noch nicht im Detail bekannt.

Für das Verständnis der Motilität im Gastrointestinaltrakt größerer Spezies, können Ergebnisse, die an kleinen Labornagern erarbeitet wurden nur teilweise herangezogen werden. Dies lässt sich beim Vergleich der an Labortieren gewonnenen Daten mit denen aus größeren Spezies wie Hund und Schwein schlussfolgern.

Das Colon größerer Haussäugetiere und des Menschen scheint also andere Motilitätsmuster und zumindest zum Teil andere intrinsische nervale Steuerungsmechanismen zu besitzen als das Colon von Maus, Ratte oder Meerschweinchen. Allerdings gibt es für diese großen Spezies bisher kaum Untersuchungen zur Kontrolle der Colonmotorik durch enterische Nervenzellen.

Zum Verständnis der Colonmotilität ist allerdings nicht nur die Untersuchung der Interaktion zwischen enterischen Nervenzellen und den einzelnen Muskelschichten wichtig, sondern auch die Erfassung des Zusammenspiels zwischen Ring- und Längsmuskulatur in der Colonwand.

Bisher existieren kaum Messsysteme die eine simultane Erfassung der Aktivität beider Muskelschichten in vitro ermöglichen. Der Prototyp eines dafür geeigneten Messsystems wurde von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit entwickelt. Der Aufbau ermöglicht die Untersuchung von Darmpräparaten größerer Spezies wie dem Schwein, die sich in den letzten Jahren als Modelle zur Untersuchung von Fragestellungen aus dem humanen Gastrointestinaltrakt etablieren konnten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine funktionelle Etablierung des entwickelten Messsystems zur Anwendung am distalen Colon des Schweins. Es sollten sowohl erste Daten zur Erfassung spontaner Motilität der Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur erhoben werden, als auch die Beteiligung cholinerg und nitrgerger Nervenzellen an der Motilitätssteuerung erfasst werden. Um dabei eine mögliche Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse mit solchen aus früheren eindimensionalen Messungen an isolierten Muskelstreifen zu überprüfen wurden sämtliche Experimente parallel zur neuen zweidimensionalen Messmethode auch mit der eindimensionalen Messmethode durchgeführt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchsvorbereitung

#### 3.1.1 Gewinnung des Organmaterials

Das Organmaterial wurde auf einem Schlachthof (Fa. Christian Hahn, Otterwisch, Sachsen, D) von Schweinen gewonnen, die regulär zur Lebensmittelgewinnung geschlachtet wurden.

Die Organentnahme erfolgte an 21 weiblichen Schlachtschweinen mit einem Gewicht zwischen 200 und 250 kg. Die Tiere wurden mit einer Elektrozange betäubt und unmittelbar danach durch Blutentzug getötet. Der Zeitraum zwischen Tötung und Organentnahme betrug maximal zehn Minuten. Den Tieren wurde ein circa 15 cm langer Darmabschnitt aus dem Bereich des Dickdarms (Colon descendens) entnommen. Um dabei die Entleerung des Darmes und eine Verunreinigung der serösen Überzüge des Organmaterials mit Ingesta zu verhindern, wurde das Darmrohr an seinem oralen und analen Ende jeweils mit einer Schnur ( $\varnothing$  2 mm) abgebunden. Mit einer Schere wurde der beschriebene Darmbereich dann in toto oral bzw. anal der Abbildung herausgeschnitten. Zur späteren Orientierung wurde das orale Ende des Darmes durch eine Klemme und zusätzlich durch einen 1 cm langen Einschnitt markiert. Direkt nach der Entnahme wurde das Organmaterial in gekühlter (4 °C) Krebslösung (Zusammensetzung in mmol/l: NaCl 117,0/ KCl 4,7/ MgCl<sub>2</sub> 1,2/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2/ CaCl<sub>2</sub> 2,5/ NaHCO<sub>3</sub> 25,0/ Glucose 11,0; pH-Wert 7,4) zum Labor im Veterinär-Physiologischen Institut, An den Tierkliniken 7, 04103 Leipzig verbracht. Die Transportzeit betrug ca. 30 Minuten. Die Krebslösung wurde vor jedem Versuch frisch hergestellt und mit Carbogen, einem Gasgemisch aus fünf Volumenteilen Kohlenstoffdioxid und 95 Volumenteilen Sauerstoff, permanent begast.

#### 3.1.2 Gewebeaufbereitung

Die Präparation der Darmmuskulatur erfolgte maximal eine Stunde nach Entnahme des Gewebes. Direkt nach Ankunft im Labor wurde der Darm mit kalter (4 °C) Krebslösung gewaschen und von Ingesta befreit. Daran anschließend wurde der Darm mit einer Präparierschere mesenterial eröffnet und in eine mit Sylgard (Sylgard® 184-, Dow Corning, WI, USA) beschichtete und mit kalter Krebslösung befüllte Petrischale (20 cm  $\varnothing$ ) verbracht. Das Gewebe wurde mit Präpariernadeln (Fine Science Tools, Heidelberg, D) zur weiteren Präparation auf dem Sylgard befestigt. Für alle Versuche zur Motilitätsmessung wurden die *Tunica mucosa* und *Tela submucosa* mit Hilfe einer feinen Präparierschere (Fine Science Tools, Heidelberg, D) unter Zuhilfenahme einer Binokular Lupe (SZ40, Olympus, Hamburg, D) vorsichtig abpräpariert. Damit standen für die im Folgenden beschriebenen Motilitätsversuche Darmmuskelpreparate bestehend aus den beiden Muskelschichten der Tunica muscularis, dem *Stratum circulare* und *Stratum longitudinale*, im Folgenden als Zirkulärmuskulatur (ZM) und Längsmuskulatur (LM) bezeichnet, und dem dazwischenliegenden myenterischen Plexus, sowie der Serosa zur Verfügung. Während der Präparation wurde die Krebslösung in der Präparierschale in einem Intervall von zehn Minuten erneuert.

### 3.2 Versuchsanordnung

Die oben beschriebenen Darmmuskelpreparate wurden in Organbädern vital erhalten. Die Organbäder waren den jeweiligen Apparaturen zugehörig und sind unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben. Als Korrelat der Motilität der Darmmuskulatur wurden isometrisch Kräfte in Gramm [g] pro Zeiteinheit [s] gemessen. Die Verwendung der Maßeinheit „g“ hat historische Gründe, da Experimente an isolierten glattemuskulären

Organen und deren Aufzeichnung der Muskelkräfte ursprünglich mittels mechanischer Hebelbewegungen auf Rußtrommeln erfolgte und für die Eichung der Kraftgeber bzw. Kraftsensoren im Labor, damals wie auch heute, Gewichtsstücke aus einem Wägesatz, geeicht in „Gramm“ (=Masseeinheiten) verwendet wurden. Diese Vorgehensweise hat sich bis heute gehalten und darum findet die Einheit der Kraft, das Newton [N], gleichwohl seit 1978 international eingeführt, beim praktischen Arbeiten im Labor verhältnismäßig wenig Anwendung.

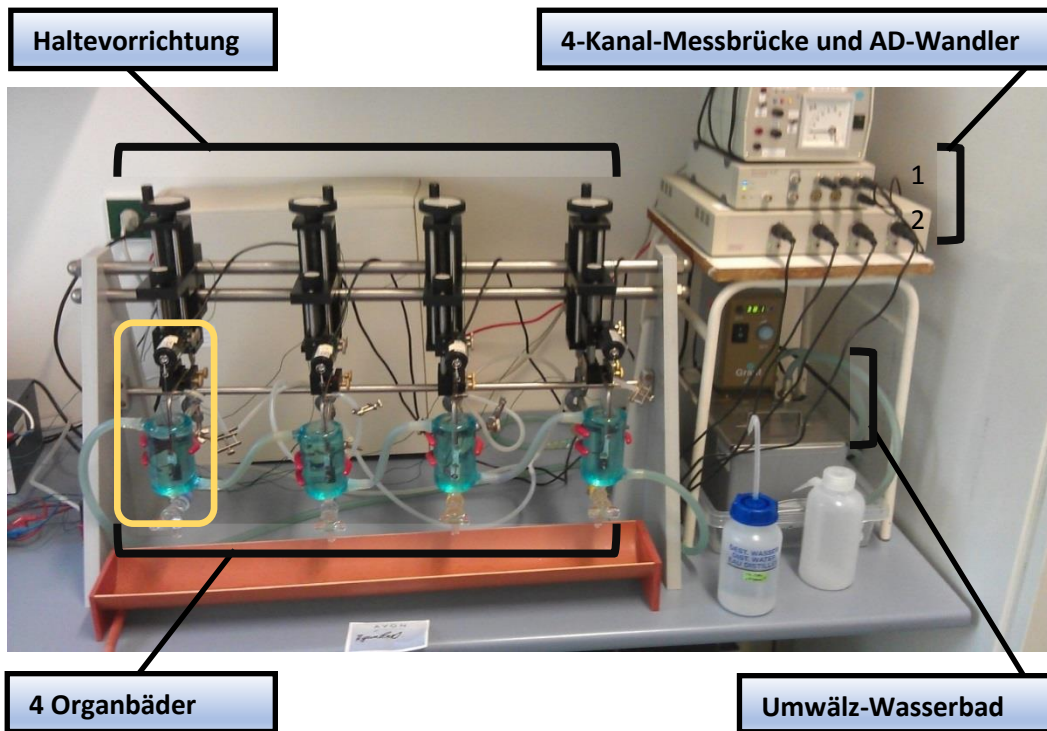
Die Messung der Kräfte erfolgte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Messapparaturen. An beiden Apparaturen wurden die Fixation des Darmgewebes, die Bauart, Anordnung und Parameter der elektrischen Feldstimulation (Beschreibung unter 3.2.3) sowie die habituellen Verhältnisse in den Organbädern, vermittelt durch die eingesetzte Nährlösung, gleich gestaltet. Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten der Messapparaturen sowie die verwendeten Chemikalien zur Herstellung der Nährlösung und die in den Experimenten eingesetzten Hemmstoffe näher beschrieben.

### **3.2.1 Apparatur: 1, eindimensionale Motilitätsmessung**

Apparatur 1 war eine Messvorrichtung zur Untersuchung von Motilitätsmustern in einer Dimension. Dies bedeutet, dass damit Untersuchungen zur Darmmotilität dem Verlauf einer Muskelschicht folgend, an einem einzelnen Darmmuskelstreifen gemacht werden können (siehe Abb. 1 und 2). Diese Art der Motilitätsuntersuchung ist weit verbreitet und kommt bei Motilitätsmessungen an der gastrointestinalen Muskulatur in vitro standardmäßig zum Einsatz (GRAHAM und SNEDDON 1993, KÖHN 2000, MÜNNICH 2009, BROAD et al. 2014, LEFEBVRE et al. 2017).

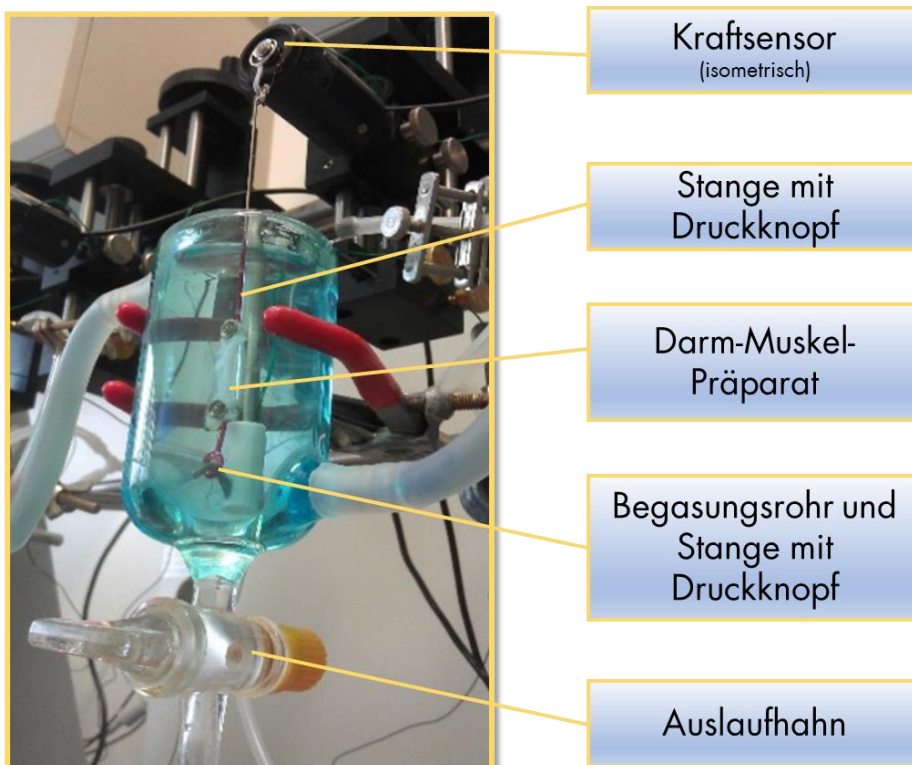
Die Versuchsanordnung bei Apparatur 1 bestand aus einem vertikalen Organbadsystem mit vier separaten Organbädern, einer Haltevorrichtung für die Organbäder, einem Umwälz-Wasserbad, vier isometrischen Kraftsensoren (MLT 0201 Sensitive Isometric Transducer 0-25 g, AD-Instruments, Oxford, UK), einer 4-Kanal-Messbrücke (Quad Bridge ML-118, AD-Instruments, Oxford, UK), einem Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler, Power Lab 4/25 ADDi ML 845, AD-Instruments, Oxford, UK), einer Mess- und Analysesoftware (Chart v5.2 für Windows, AD-Instruments, Oxford, UK) und einem Computer (Abb. 1).

Die Organbäder wurden in einer Haltevorrichtung befestigt und konnten separat horizontal und vertikal justiert werden. Jedes Organbad war doppelwandig, nach oben offen, hatte ein Fassungsvermögen von 90 ml und verfügte über einen verschließbaren Ablauf zum Austausch der Nährlösung. Das Volumen der Nährlösung in den Organbädern betrug 80 ml. Die Nährlösung in den Organbädern wurde bei einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten und fortwährend über ein Begasungsrohr mit Carbogen begast. Die Organpräparate wurden, entsprechend ihrer zu untersuchenden Muskulaturrichtung, an ihren Enden mit Druckknöpfen (Durchmesser 5 mm) fixiert. Zur Übertragung der erzeugten Kräfte wurde das Darmpräparat mit einem Haken am unteren Druckknopf im Organbad als Widerlager befestigt. Über den oberen Druckknopf wurden die Kräfte mit einer Edelstahl-Stange (2 mm Durchmesser, 5 cm Länge) auf den Kraftsensor übertragen. Zu jedem Organbad gehörte ein eigener isometrischer Kraftsensor. Das Messsignal der Kraftsensoren wurde durch die 4-Kanal-Messbrücke analog aufbereitet und durch den Analog-Digital-Wandler an die Mess- und Analysesoftware auf den Computer übertragen und gespeichert.



**Abb. 1: Aufbau der Apparatur 1, Übersichtsabbildung**

Die Messapparatur 1 bestand aus 4 Organbädern, die in einer Haltevorrichtung befestigt waren, einem Umwälz-Wasserbad, einer 4-Kanal-Messbrücke (2) und einem Analog-Digital (AD)-Wandler (1). Detailbeschreibung von Organbad 1 (gelber Rahmen) siehe Abbildung 2



**Abb. 2: Aufbau der Apparatur 1, Detailbeschreibung von Organbad 1**

Jedes der vier Organbäder des Setups der Apparatur 1 bestand aus einem doppelwandigen Organbad mit Auslaufhahn. Im Organbad selbst wurde das Darm-Muskel-Präparat durch die auf 37°C temperierte und mit Carbogen begaste Krebslösung vital erhalten. An den Enden wurde das Darm-Muskel-Präparat mittels Druckknöpfen an je einer zur Kräfteübertragung benutzen Stange am Kraftsensor und am Begasungsrohr als Widerlager befestigt. Dort strömte zusätzlich das Carbogen aus.

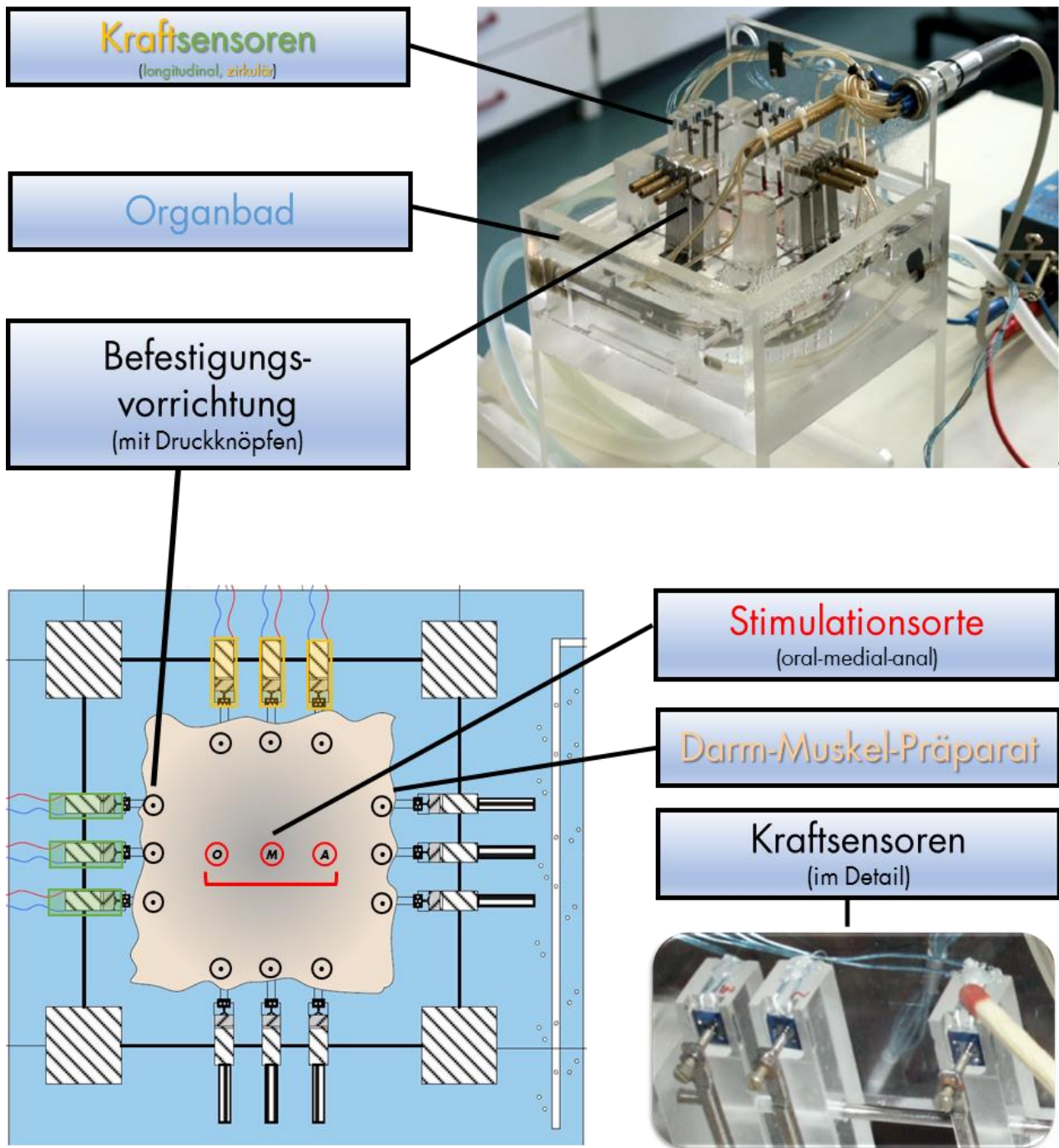
### **3.2.2 Apparatur 2: zweidimensionale Motilitätsmessung**

Bei Apparatur 2 handelte es sich um einen Prototyp, der im Rahmen meiner Diplomarbeit am Veterinär-Physiologischen Institut in Leipzig angefertigt wurde (OTTO 2006).

Mit der Apparatur 2 bestand die Möglichkeit, die Darmmotilität in zwei Dimensionen, an Zirkulär- und Längsmuskulatur gleichzeitig, und zudem simultan an mehreren benachbarten Positionen je Muskelschicht aufzuzeichnen.

Die Versuchsanordnung bestand aus einem horizontal angeordneten Organbad mit einem maximalen Fassungsvermögen von 900 ml. Das tatsächliche Volumen der Nährlösung im Organbad betrug 800 ml. Die Nährlösung wurde in diesem Organbad über ein U-Rohr, welches mit einem Umwälz-Wasserbad verbunden war, konstant auf 37°C temperiert und über einen perforierten Silikonschlauch mit Carbogen begast. Das Organbad war nach oben hin offen und verfügte über einen verschließbaren Ablauf zum Austausch der Nährlösung. Die Befestigung des Darmgewebes erfolgte an einer separat in das Organbad eingesetzten mechanischen Vorrichtung. An dieser Vorrichtung wurde das Gewebe, wie auch in Apparatur 1, mit Druckknöpfen im Durchmesser von 5 mm an insgesamt 12 Punkten befestigt (siehe Abb. 3). Dabei lagen sich je Muskulaturrichtung drei Befestigungspunkte gegenüber. Die Abstände zwischen benachbarten Befestigungspunkten betrugen circa 2 cm. Die Messung der Darmmotilität (Kraftmessung) erfolgte mittels sechs isometrischer Miniatur-Kraftsensoren (0-500 mN (0-50 g), Fa. IB-Hoch, Buggingen, D), drei je Muskulaturrichtung (im Folgenden als Messkanal oder Kanal bezeichnet) einem 6-Kanal-Messverstärker (Fa. IB-Hoch, Buggingen, D), einem AD-Wandler (Fa. IB-Hoch, Buggingen, D) und einer für diese Apparatur programmierten Messsoftware (LabVIEW 12.0 Studentenversion, National Instruments, Austin, Texas, USA). Alle Messwerte wurden Hilfe der Messsoftware auf einem Computer aufgezeichnet und gespeichert.





**Abb. 3: Aufbau der Apparatur 2**

Messapparatur 2 (oben rechts im Original, unten links schematisch in der Draufsicht) bestand aus einem Organbad mit Befestigungsvorrichtung zur Fixation des Darm-Muskel-Präparates. Die roten Kreise markieren die Stimulationsorte der EFS (O = oral, M = medial, A = anal). Jeweils 3 Kraftsensoren zur isometrischen Messung der Zirkulär- (gelb markiert) und Längsmuskulatur (grün markiert) waren orthogonal zueinander am Präparat befestigt. Die Kraftsensoren sind unten rechts in der Abbildung im Detail dargestellt und zum Größenvergleich mit einem Streichholz abgebildet.



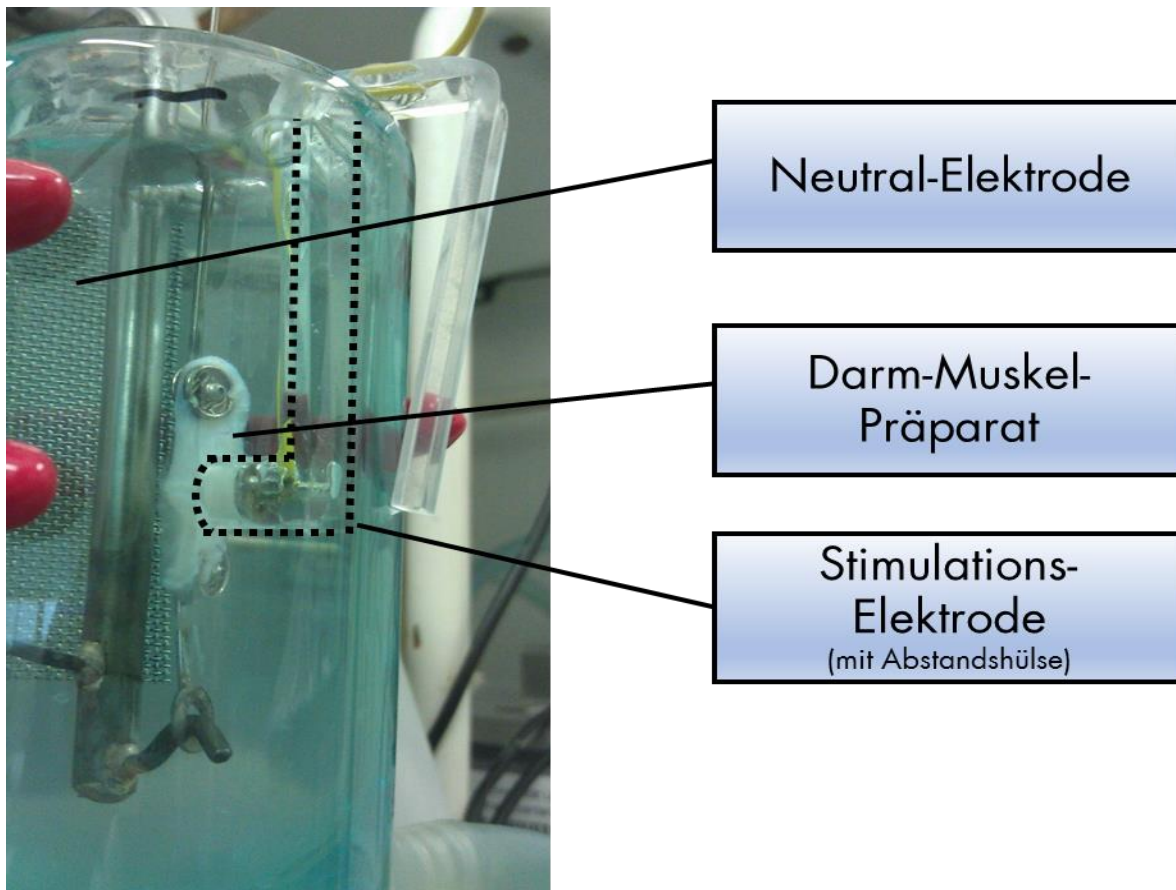
### 3.2.3 Elektrische Feldstimulation (EFS)

Die Elektrische Feldstimulation erfolgte an beiden Apparaturen mittels monopolarer Elektroden gleicher Bauart. Jede Elektrode bestand aus einer runden Edelstahlfläche mit einem Durchmesser von 5 mm. Darüber wurde eine Abstandshülse aus Plexiglas gestülpt, sodass stets ein definierter Abstand von 5 mm zum Gewebe gewährleistet war und dieses nicht direkt von der Elektrode berührt werden konnte.

Die elektrischen Reize wurden durch einen Reizgenerator der Firma Grass (Grass S88X, GRASS Technologies, Warwick, USA) erzeugt, welcher Rechteckimpulse mit einer Impulsbreite von 0,5 ms in einer Frequenz von 20 Hz und einer Amplitude von 50 V für die Dauer von 10 s generierte.

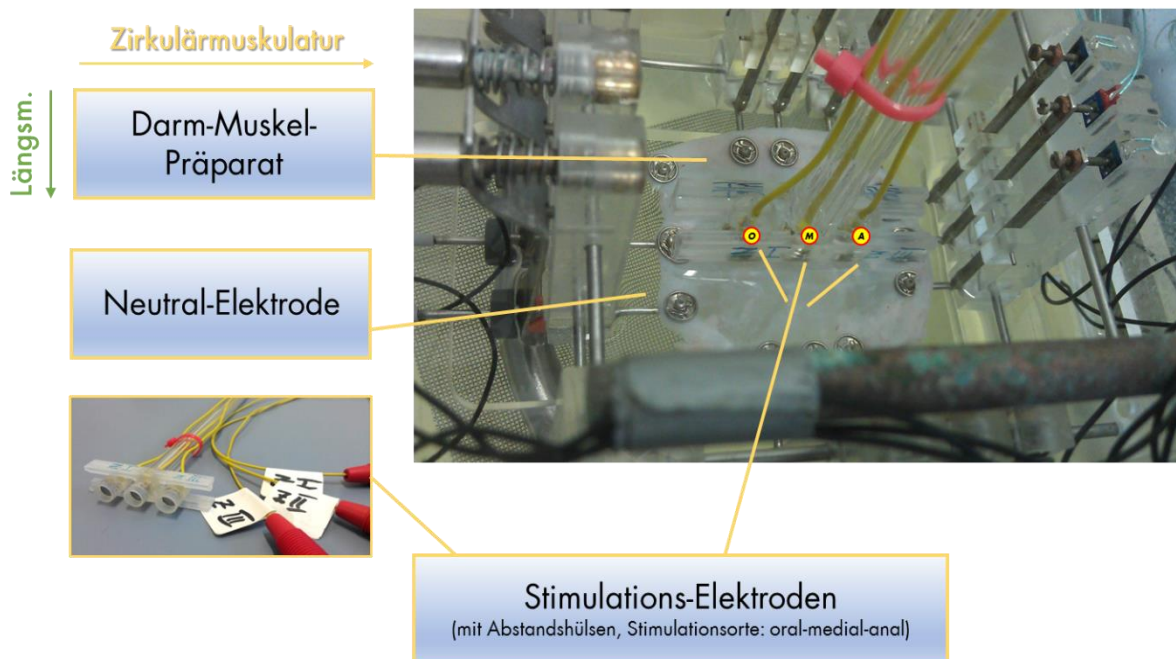
An Apparatur 1 wurde in jedem Organbad eine separate Elektrode verwendet (Abb. 4). Als Neutralelektrode diente hier ein Edelstahlgitter mit einer Kantenlänge von 1,5 x 4 cm im Abstand von 2 cm hinter dem Gewebe. Die EFS erfolgte in diesem Setup jeweils zentral am Präparat.

An Apparatur 2 wurden insgesamt drei Elektroden auf einer Schiene gelagert, wodurch sie bei Bedarf geringfügig verschoben werden konnten (Abb. 5). Als Neutralelektrode diente auch hier ein Edelstahlgitter mit einer Kantenlänge von 6 x 6 cm, welches im Abstand von 2 cm unter dem Gewebe angebracht wurde. Die EFS erfolgte hier an drei verschiedenen Positionen: eine medial am Präparat und jeweils eine circa 2 cm oral und anal der medialen Position, bezogen auf die Ausrichtung der Zirkulärmuskulatur.



**Abb. 4: Elektrische Feldstimulation an Apparatur 1**

In der Mitte des Darm-Muskel-Präparates wird die Stimulationselektrode platziert. Zwischen der Elektrode und dem Darmmuskel-Präparat befindet sich eine Abstandshülse aus Plexiglas. Hinter dem Darm-Muskel-Präparat liegt die Neutral-Elektrode bestehend aus einem Edelstahlgitter.



**Abb. 5: Elektrische Feldstimulation an Apparatur 2**

Die Stimulations-Elektrode wird über dem Darm-Muskel-Präparat platziert. Unter dem Darm-Muskel-Präparat liegt eine Neutral-Elektrode. Auf dem kleinen Bild unten links sind die Stimulationselektroden im Detail zu sehen.

### 3.2.4 Hemmstoffe

Um beteiligte cholinerge und nitrerge Komponenten zur Kontrolle der Darmmotilität (spontan und EFS-induziert) zu verifizieren, wurden verschiedene Hemmstoffe eingesetzt.

Zur Untersuchung muskarinerger Mechanismen wurden die Gewebe mit **Atropin** (A0257; Sigma, Deisenhofen, D) in aufsteigender Konzentration (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Atropin ist eine Substanz aus der Familie der Nachtschattengewächse, unter anderem der Tollkirsche, und konkurriert mit dem Neurotransmitter Acetylcholin als kompetitiver Hemmstoff um muskarinerge Cholinorezeptoren, unter sehr hohen Dosen auch um nikotinartige Cholinorezeptoren (FREY 2009).

Zur Untersuchung nitrerger Mechanismen erfolgte eine Inkubation der Gewebe mit NG Nitro L arginine methylester Hydrochlorid (**L-Name**) (N 5751, Sigma, Deisenhofen, D). L-Name ist ein substituiertes Argininanalogon. Es inhibiert die Stickstoffmonoxidsynthese kompetitiv, wodurch die Bildung und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus nitrergen Nervenzellen gehemmt wird (ALDERTON et al. 2001). L-Name wurde jeweils in den Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  verwendet.

Zur Untersuchung nikotinerger Mechanismen wurden die Gewebe mit Hexamethonium-Chlorid (Hexamethonium, **Hex**) (H-2138, Sigma, Deisenhofen, D) inkubiert. **Hex** ist ein Antagonist an neuronalen nicotinergen Acetylcholinrezeptoren. Es bindet, speziell in autonomen Ganglien, an diesen Rezeptor, wodurch eine Erregungsübertragung gehemmt wird (FREY 2009). Hexamethonium wurde ebenfalls in aufsteigender Konzentration (10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

## 3.3 Versuchsdurchführung

Alle Versuche wurden zeitparallel mit beiden Apparaturen durchgeführt. Die Versuchsbedingungen (Puffer, Begasung, EFS) wurden dabei in beiden Apparaturen gleich gestaltet. Die verwendeten Präparate für beide

Apparaturen stammten in jedem Versuch jeweils vom gleichen Tier und wurden aus direkt benachbarten Bereichen des Colons entnommen. Beide Apparaturen wurden im Vorfeld an jedem Messkanal mit Eichgewichten kalibriert, sodass die gemessene Kraft in der Gewichtseinheit g aufgezeichnet werden konnte. Die Darmmuskelpreparate wurden nach der Präparation in die Organbäder der jeweiligen Apparaturen verbracht. Bei Apparatur 1 wurde in Organbad eins und zwei je ein Darmmuskelstreifen der Zirkulärmuskulatur (ZM) und in die Organbäder drei und vier je ein Darmmuskelstreifen der Longitudinalmuskulatur (LM) in einer Größe von jeweils 1 x 2 cm eingespannt. In Apparatur 2 wurde nur ein Darmmuskelpreparat in einer Größe von 5 x 5 cm eingespannt. Nach dem Einspannen der Präparate wurden die Elektroden für die EFS in den Organbädern positioniert. Nach Befestigung und Verbringen der Präparate in die entsprechenden Setups, wurden alle Präparate je Messkanal mit einer Gewichtskraft von 10 g unter Spannung gebracht. Diese Vorspannung erzeugte bei den Präparaten in Apparatur 1 eine relative Dehnung von ca. 35 % und in Apparatur 2 von ca. 30 %.

**Tabelle 1: Verwendetes Organmaterial in den jeweiligen Versuchsteilen**

	Versuche	Tier-Nr.	N	Anzahl Darm-Muskel-Präparate je N	
				App. 1	App. 2
Voruntersuchungen	TTX-Sensitivität der EFS	1 - 3	3	4	1
	Funktioneller Ausschluss einer direkten EFS-Wirkung außerhalb des Stimulationsortes	4 - 6	3	0	1
Funktionelle Charakterisierung enterischer Schaltkreise (Spontanmotilität und Nerv-Muskel-Antworten nach elektrischer Feldstimulation)	Atropin	7 - 11	5	4	1
	L-Name	12 - 16	5	4	1
	Hexamethonium	17 - 21	5	4	1

### 3.3.1 Voruntersuchungen

Im Rahmen von Voruntersuchungen an separaten Präparaten sollte abgesichert werden, dass die EFS nur neuronale Strukturen in den Gewebestücken stimuliert und gleichzeitig ausschließen, dass durch die EFS ein elektrisches Feld generiert wird, welches die Neurone auch außerhalb des Stimulationsortes elektrisch erregt. Das Vorgehen wird im Folgenden beschrieben.

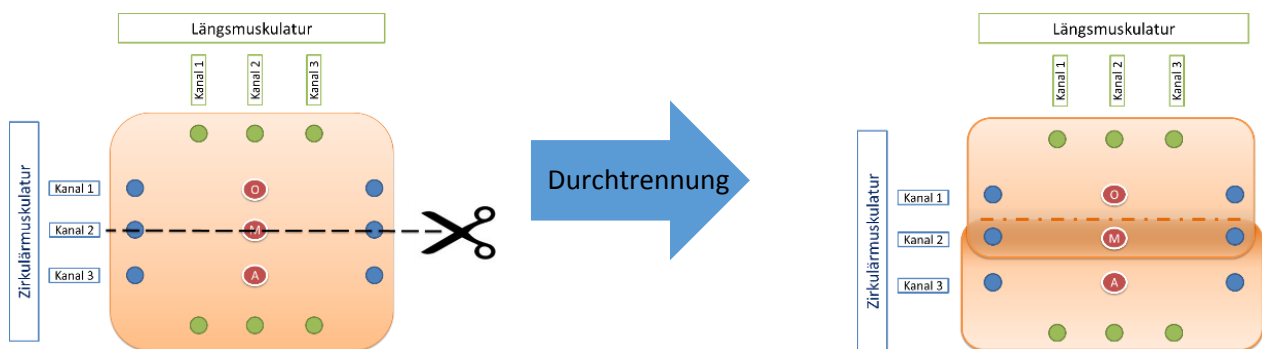
#### 3.3.1.1 Tetrodotoxin-Citrat (TTX)-Sensitivität der EFS

Zur Abgrenzung EFS-induzierter neuronaler und nicht neuronal vermittelter Muskelaktivitäten, wurde Tetrodotoxin-Citrat (**TTX**) (BN-0518, Biotrend Chemicals AG, Zürich, CH) verwendet. **TTX** ist ein Nervengift, welches selektiv spannungsgesteuerte Natriumkanäle an Nervenzellen blockiert (Hafemann 1972). In Folge dessen können keine Aktionspotentiale mehr ausgebildet und weitergeleitet werden. Nach **TTX**-Applikation entfällt also der EFS-induzierte neural vermittelte Anteil der Muskelantworten. In drei Untersuchungen wurden fünf EFS je Messapparatur, Gewebe und Stimulationsort unter Kontrollbedingungen durchgeführt und die motorischen Antworten der Präparate aufgezeichnet. Im Anschluss wurden die Präparate mit dem

Hemmstoff **TTX** in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  für 30 Minuten inkubiert und erneut in gleicher Weise elektrisch stimuliert. Die Ergebnisse sind im Ergebnissteil unter Punkt 4.1.1 dargestellt.

### 3.3.1.2 Funktioneller Ausschluss einer direkten EFS-Wirkung außerhalb des Stimulationsortes

In der Apparatur 2 wurde an verschiedenen benachbarten Bereichen der Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur eine Muskelantwort auf die lokal applizierte EFS registriert. Muskelantworten, die nicht unmittelbar am Stimulationsort, sondern in benachbarten Bereichen messbar sind, sollten auf eine spezifische Signalübertragung innerhalb der nervalen Strukturen des Gewebes zurückzuführen sein. Allerdings musste zunächst ausgeschlossen werden, dass durch das per EFS erzeugte elektrische Feld, neuronale Strukturen auch außerhalb des Stimulationsortes (also unter den jeweils nicht aktiven Stimulationselektroden) überschwellig gereizt wurden. Dazu wurden Präparate von 3 Tieren jeweils dreimal an oraler und analer Position stimuliert. Im Regelfall wurden dabei sowohl bei oraler als auch bei analer Stimulation Muskelantworten an allen Messstellen, insbesondere an der Zirkulärmuskulatur, registriert. Nun wurde das Gewebe entlang der mittleren Zirkulärmuskulatur-Befestigung durchtrennt und wieder so zusammengeführt, dass sich die beiden entstandenen Gewebeteile überlappten und damit elektrisch wieder in Kontakt standen (siehe Abb. 6).



**Abb. 6:** Schema zur Vorgehensweise, um eine direkte EFS-Wirkung außerhalb des Stimulationsortes ausschließen zu können

Im Anschluss daran wurde an den beiden oben beschriebenen Positionen eine wiederholte EFS durchgeführt. Falls nach Durchtrennung des Gewebes, und somit der innerliegenden nervalen Strukturen an den vom Stimulationsort entfernten Messstellen keine Muskelantworten mehr gemessen werden können, ist eine unspezifische räumliche Ausbreitung bzw. Wirkung der EFS über den Stimulationsort hinaus nicht gegeben. Vielmehr handelt es sich dann um neuronal weitergeleitete Nerv-Muskel-Interaktionen. Die Ergebnisse sind im Ergebnissteil unter Punkt 4.1.2 dargestellt.

### 3.3.2 Funktionelle Charakterisierung enterischer Schaltkreise

Zur Erfassung der funktionellen Beteiligung cholinerg sowie nitrerger Neurone an den zu charakterisierenden Nerv-Muskel-Interaktionen wurde stets wie folgt vorgegangen: Nach Einspannen des Gewebes erfolgte eine 30-60 Minuten lange Äquilibrationsphase mit anschließendem Wechsel der Krebslösung in jedem Organbad. Anschließend wurde die spontane Motorik der Präparate unter Kontrollbedingungen für 15 Minuten aufgezeichnet. Nach Registrierung der Spontanmotilität wurden elektrische Feldstimulationen dreimal im Abstand von drei Minuten an sämtlichen in Apparatur 1 eingespannten Präparaten durchgeführt und deren Antworten aufgezeichnet. An Apparatur 2 erfolgte dies separat an den Positionen oral, medial und anal, dreimal je Position in Folge und auch jeweils im Abstand von drei Minuten. Im Anschluss an die EFS wurde wieder die Krebslösung in allen Organbädern gewechselt. Die

erhobenen Daten bis zu diesem Punkt werden in den Ergebnissen als Daten unter Kontrollbedingungen dargestellt. Nun schlossen sich Untersuchungen unter Hemmstoffeinfluss an. Dazu wurde der jeweilige Hemmstoff der Krebslösung in den Organbädern zugesetzt. Es folgte eine 30-minütige Äquilibrationsphase, der sich ein kompletter Wechsel der Krebslösung plus erneute Zugabe des Hemmstoffs anschloss. Nun wurde die Spontanmotilität unter Einfluss des eingesetzten Hemmstoffs in der Konzentrationsstufe eins aufgezeichnet und daran anschließend die EFS wie oben beschrieben durchgeführt. Diese Prozedur wurde für jeden Hemmstoff und jede der drei Konzentrationsstufen eines Hemmstoffs durchgeführt. Für jeden Hemmstoff (Atropin, L-Name, Hex) und dessen 3 Konzentrationsstufen gab es 5 Versuchsdurchläufe, bei dem je Versuchsdurchlauf fünf Darmpräparate stets von einem Tier in Apparatur 1 (vier Präparate) und 2 (ein Präparat) verwendet wurden. Die Anzahl der Versuchstiere sowie der entsprechenden Darmpräparate sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle Darmpräparate zeigten sowohl Spontanmotilität als auch Reaktionen auf eine der Kontroll-EFS, weshalb kein Präparat verworfen werden musste.

### **3.3.3 Datenauswertung und Statistik**

#### **3.3.3.1 Spontanmotilität**

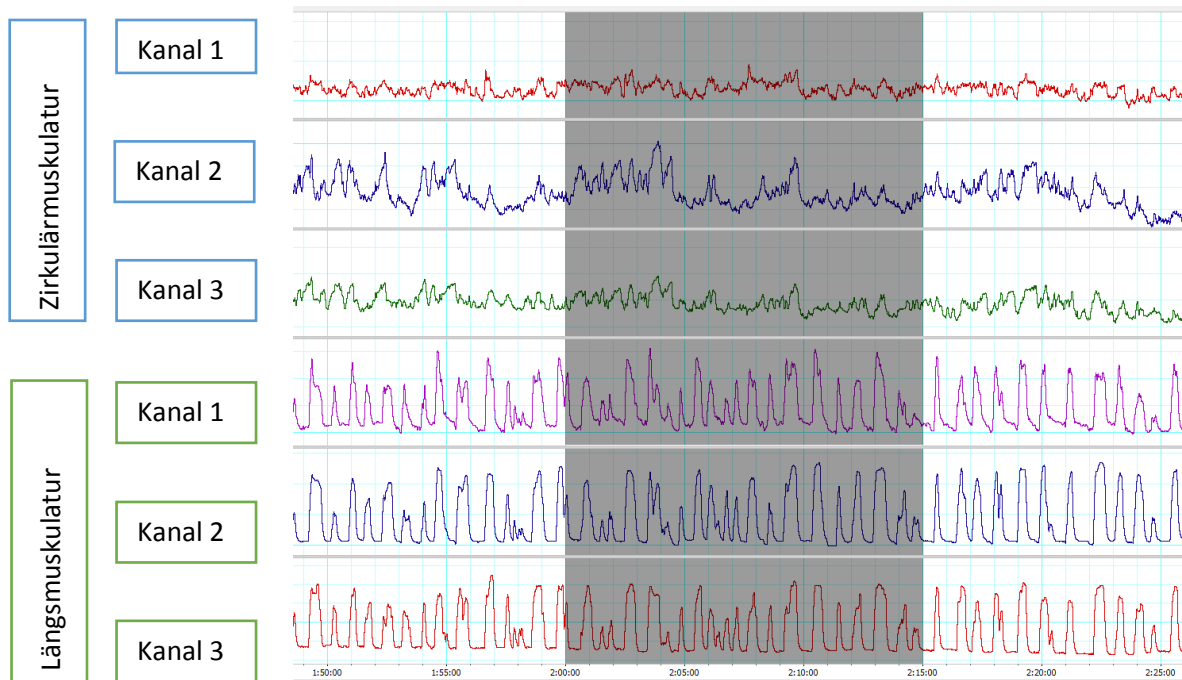
Die Spontanmotilität wurde mit beiden Apparaturen zunächst unter Kontrollbedingungen und anschließend unter Hemmstoffeinfluss nach Zugabe dreier verschiedener Konzentrationen gemessen, wie unter 3.2.2 beschrieben.

Zur Bewertung der Spontanmotilität von Zirkulär- und Längsmuskulatur wurden aus den Kraftmesswerten für jeden Messkanal über einen definierten Zeitraum (15 Minuten) a) die Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC [g x s]) sowie b) die Standardabweichung (SD [g]) der Kraftmesswerte abgeleitet (siehe auch Abb. 8). Die AUC schließt bei ihrer Berechnung sowohl Amplitude als auch Frequenz der Muskelkontraktionen mit ein. Sie soll damit für die Bewertung der Spontanmotilität im Bemessungszeitraum ein Ausdruck für die „Stärke“ dieser sein.

Um die Spontanmotilität weiter zu charakterisieren wurde die Standardabweichung der aufgezeichneten Kraftmesswerte pro Messkanal über einen Zeitraum von 15 min abgeleitet. In unseren Bewertungen soll dieses die Spontanmotilität in ihrer „Agilität“ beschreiben. Die Erfassung beider Parameter erfolgte sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Hemmstoffzugabe jeweils zu Zeitpunkten im Versuchsablauf unter 3.2.2 und in Abb. 7 dargestellt. Für eine Vergleichende Bewertung der SD unter Kontrollbedingung wurde aus SD und Mittelwert der Kraftmesswerte über den o.g. Zeitraum von 15 Minuten je Versuch und Messkanal der Variationskoeffizient gebildet. Dies normiert die Standardabweichung und macht Vergleiche besser möglich.

Zur Beurteilung der „Wirkung“ der eingesetzten Hemmstoffe auf die Spontanmotilität wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit aus AUC und SD nach und vor Hemmstoffzugabe ein Quotient gebildet, welcher im Ergebnis eine reelle Zahl ohne Maßeinheit ergab und im Folgenden als Index<sub>Spontanmotilität-AUC</sub> bzw. Index<sub>Spontanmotilität-SD</sub> bezeichnet wird. Die Wirkung des eingesetzten Hemmstoffes wurde dann als stimulierender Effekt bewertet, wenn der Index als statistisch signifikant  $> 1$  bzw. als hemmend bewertet, wenn der Index als signifikant  $< 1$  ermittelt werden konnte. Die Darstellung des Hemmstoffeinflusses auf die Spontanmotilität folgt der Frage, ob durch die eingesetzten Hemmstoffe die Spontanmotilität von Zirkulär- und Längsmuskulatur gehemmt oder verstärkt wird. Ein Vergleich der Ergebnisse zwischen der Apparatur 1 und der Apparatur 2 sollte zudem zeigen, welchen Einfluss die Messmethode auf die Ergebnisse hatte. AUC sowie

SD wurden hierfür pro Messkanal und Apparatur jeweils über einen Zeitraum von 15 min ermittelt (Abb. 8). Die Messwerte aus Apparatur 1 (2 Organbädern je Muskulaturschicht) und Apparatur 2 (3 Messkanäle je Muskulaturschicht), wurden für jedes zu einem Mittelwert je Muskulaturschicht und Apparatur zusammengefasst. Aus diesen Mittelwerten der einzelnen Tiere wurde dann im Folgenden der Median errechnet.

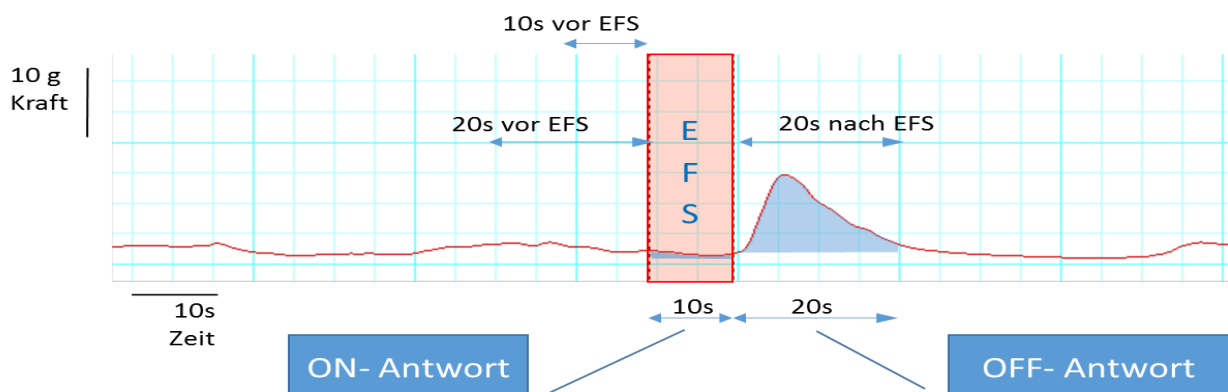


**Abb. 7: Original Messkurve (Apparatur 2), Spontanmotilität an 3 Messkanälen je Muskulatur**

Markierung (graues Feld) über 15 Minuten, Berechnung der AUC und SD aus diesem Bereich für jeden Messkanal und Parameter separat

### 3.3.3.2 EFS-Antworten

Eine EFS erstreckte sich über eine Stimulationsdauer von zehn Sekunden. Sie induzierte dabei unter Kontrollbedingungen zweiphasige Nerv-Muskel-Antworten (EFS-Antworten). EFS-Antworten, die während einer EFS auftraten, wurden als ON-Antworten bezeichnet, und EFS-Antworten, die unmittelbar nach Ende einer EFS auftraten, als OFF-Antworten.



**Abb. 8: Bemessung der AUC an ON- und OFF-Antworten an einem Messkanal als Beispiel**

roter Kasten = Zeitraum der EFS (10s), blaue Flächen unter der Messkurve = Area under the curve (AUC)

Zur Bewertung der Nerv-Muskel-Antworten (ON- und OFF-Antworten) in Folge einer EFS unter Kontrollbedingungen wurde jeweils aus den Wertepaaren der AUC während der EFS ( $AUC_{\text{ON-Antwort}}$  bzw.  $AUC_{\text{OFF-Antwort}}$ ) und der AUC der Spontanmotilität unmittelbar vor der EFS ( $AUC_{\text{Spontanmotilität 10 s vor EFS}}$  bzw.

$AUC_{\text{Spontanmotilität 20 s vor EFS}}$ ) ein Quotient gebildet, welcher im Ergebnis eine reelle Zahl ohne Maßeinheit ergab und hier als  $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Kontrolle}}$  bzw.  $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Kontrolle}}$  bezeichnet wird. Die **Wirkung der EFS** wurde als stimulierend bewertet, wenn der Index als signifikant  $> 1$  und hemmend, wenn der Index als signifikant  $< 1$  statistisch ermittelt werden konnte.

$$\text{Index}_{\text{EFS-ON-Kontrolle}} = \frac{AUC_{\text{ON-Antwort}}}{AUC_{\text{Spontanmotilität 10 s vor EFS}}} \quad \text{Index}_{\text{EFS-OFF-Kontrolle}} = \frac{AUC_{\text{OFF-Antwort}}}{AUC_{\text{Spontanmotilität 20 s vor EFS}}}$$

Zur Beurteilung der **Hemmstoff-Wirkung** (Atropin, L-Name, Hexamethonium in drei Konzentrationsstufen) auf die EFS-Antworten wurde auch hier ein Quotient gebildet und als  $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$  bzw.  $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$  bezeichnet. Dazu wurden Wertepaare aus der AUC der ON-Antwort unter Hemmstoffeinfluss dividiert durch die AUC der ON-Antwort unter Kontrollbedingungen, jeweils über den Zeitraum der Stimulationsdauer von 10 s, sowie aus der AUC der OFF-Antwort unter Hemmstoffeinfluss dividiert durch die AUC der OFF-Antwort unter Kontrollbedingungen über einen Betrachtungszeitraum von 20 s nach Ende der EFS gebildet.

$$\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}} = \frac{AUC_{\text{ON-Hemmstoff}}}{AUC_{\text{ON-Kontrolle}}} \quad \text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}} = \frac{AUC_{\text{OFF-Hemmstoff}}}{AUC_{\text{OFF-Kontrolle}}}$$

War der Median dieser Indices nicht signifikant verschieden von 1, so wurde dies so interpretiert, dass es unter Hemmstoffeinfluss im Vergleich zu den Kontrollbedingungen keine Unterschiede zwischen den gemessenen AUC-Werten der EFS-Antworten gab. Bei einem Index signifikant  $< 1$  wurde eine Hemmung der motorischen Antwort durch den Hemmstoff abgeleitet, bei einem Index signifikant  $> 1$  eine Verstärkung.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte getrennt nach ON- und OFF-Antworten, vergleichend zwischen Zirkulär- und Längsmuskulatur und in Abhängigkeit des Stimulationsortes an der Zirkulärmuskulatur vergleichend zwischen den benachbarten Messkanälen, sowie vergleichend zwischen Messapparatur 1 und 2. Für eine vergleichende Darstellung und Bewertung zwischen den Messmethoden für die EFS-Antworten je Muskulaturschicht, wurden die Messwerte aus Apparatur 1 (2 Organbädern je Muskulaturschicht) zu je einem Wert pro Muskulaturschicht zusammengefasst (innerhalb eines Versuches gemittelt) und für Apparatur 2 (3 Messkanäle je Muskulaturschicht) jeweils der nur mittlere Messkanal (Kanal 2) der ZM sowie LM nach medialer EFS für die Bewertung herangezogen.

### 3.3.3.3 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme LabChart 8 Reader application (AD-Instruments, Oxford, UK) und Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, New York, USA) durchgeführt. Die Messdaten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Die Daten waren weitestgehend nicht normalverteilt, wonach zur statistischen Analyse folgende nichtparametrische Verfahren angewendet wurden: Als Einstichprobentest der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, zur Testung nach Unterschieden innerhalb von Gruppen der Test nach Friedman und Post Hoc der Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau für Mehrfachvergleiche nach Bonferroni. Paarweise Vergleiche erfolgten durch den Wilcoxon-Test. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Wisker-Box-Plots. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bezeichnet, wenn das Signifikanzniveau ( $p$ )  $< 0,05$  war.



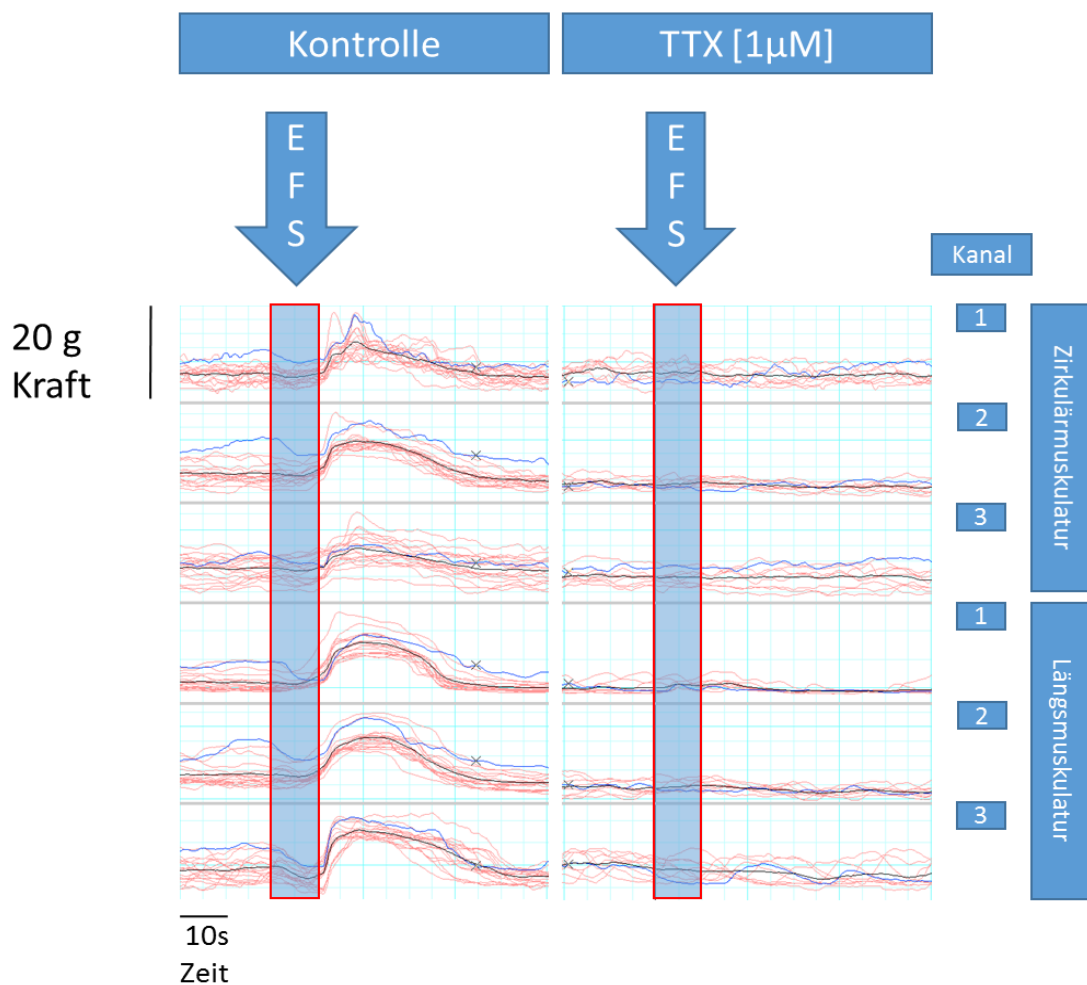
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Voruntersuchungen

#### 4.1.1 TTX-Sensitivität der EFS-induzierten Muskelantworten

EFS induzierte Muskelreaktionen können direkt durch elektrische Stimulation der Muskulatur oder indirekt durch die Stimulierung enterischer Nervenzellen hervorgerufen werden. Diese beiden Möglichkeiten können durch Messung der EFS induzierten Muskelantworten vor und nach pharmakologischer Blockade der enterischen Nervenzellen voneinander abgegrenzt werden. Unter Kontrollbedingungen (ohne Blockade der Nervenzellen) konnten mittels EFS stets sehr deutliche und reproduzierbare Muskelreaktionen induziert werden. Diese durch EFS induzierten Muskelreaktionen ließen sich durch TTX-Zugabe [1 $\mu$ M], in allen drei durchgeführten Versuchen (Tabelle 1, Tier 1-3) in beiden Setups (Apparatur 1 und 2) unterdrücken. Das zeigt, dass die EFS-induzierten Muskelreaktionen neuronalen Ursprungs waren. Diese Reaktionen werden im Folgenden daher als Nerv-Muskel-Antworten bezeichnet.

In Abbildung 9 sind alle Nerv-Muskel-Antworten während und nach EFS unter Kontrollbedingungen sowie nach TTX-Applikation innerhalb eines Experimentes exemplarisch an Apparatur 2 dargestellt.



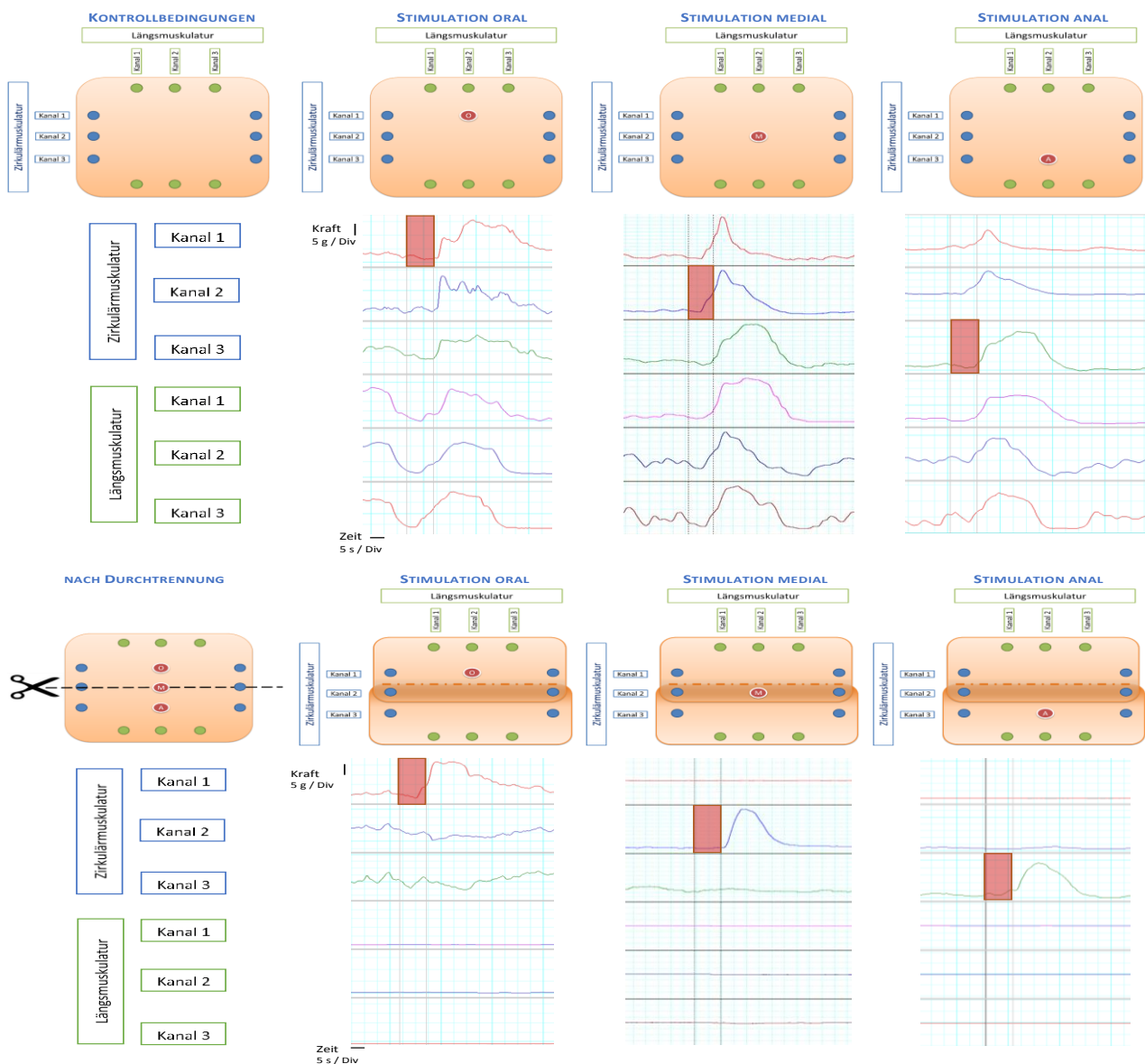
**Abb. 9: EFS, TTX-Sensitivität**

Links: Muskelantworten nach EFS (blauer Balken) unter Kontrollbedingungen an Apparatur 2. Rechts: die gleiche Abfolge an EFS nach TTX-Applikation [1 $\mu$ M], exemplarische Darstellung an Apparatur 2. Blaue und rote Linien = Messkurven aller EFS-induzierten Antworten innerhalb dieses Experimentes, schwarze Linie = Mittelwert aus blauen und roten Messkurven



#### 4.1.2 Funktioneller Ausschluss einer direkten EFS-Wirkung außerhalb des Stimulationsortes

Unter Kontrollbedingungen wurden durch die EFS, unabhängig vom Stimulationsort, in der Regel an allen Messkanälen Nerv-Muskel-Antworten induziert. Um funktionell zu unterscheiden, ob die Antworten an den weiter entfernten Messpunkten durch Stimulation lang projizierender Neurone bzw. Neuronenketten, oder durch Entstehung eines weit ausgedehnten elektrischen Feldes induziert wurden, wurde das Gewebe einschließlich der innenliegenden neuronalen Anteile mit einer Schere entlang der ZM durchtrennt. Anschließend wurde das Gewebe in der Apparatur mit überlappenden Schnittkanten wieder fixiert, und somit ein elektrischer Kontakt zwischen den Gewebeteilen wiederhergestellt (Abb. 10). Nach dieser Manipulation des Gewebes war in N=3 Versuchen an der Zirkulärmuskulatur lediglich in unmittelbarer Nähe des Stimulationsortes eine durch EFS induzierte Muskelantwort reproduzierbar. An der Längsmuskulatur konnten allerdings generell keine Muskelkontraktionen nach Durchtrennung des Gewebes registriert werden, da dies wegen der Durchtrennung technisch nicht möglich war.



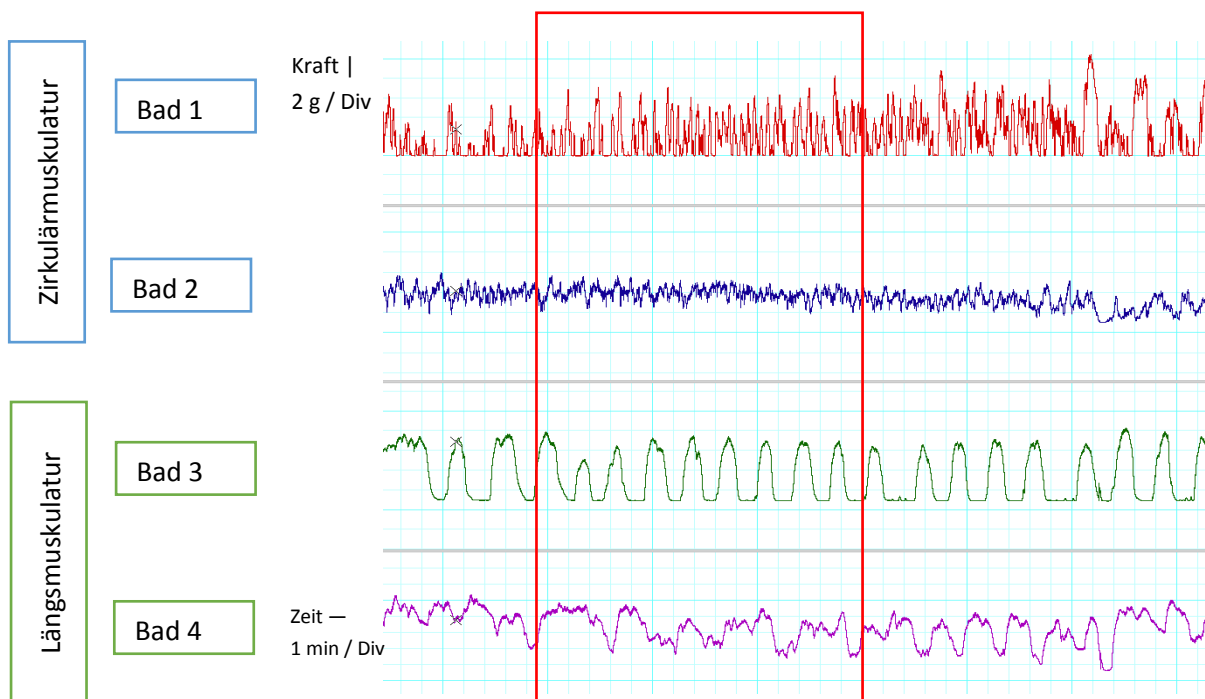
**Abb. 10: Ausschluss einer direkten EFS-Wirkung außerhalb des Stimulationsortes**

EFS induzierte Muskelantworten nach oraler, medialer und analer EFS. Zeitraum und Ort (anal, medial, oral) der EFS, bezogen auf die ZM, werden durch einen roten Kasten dargestellt. Oberer Teil der Abbildung: Kontrollbedingungen. Unterer Teil: Nach Durchtrennung des Gewebes entlang des Kanals 2 der Zirkulärmuskulatur. Unterhalb der Schemen zur Versuchsanordnung werden beispielhaft original Aufzeichnungen der Antwortmuster nach EFS unter den entsprechenden Bedingungen gezeigt.

## 4.2 Funktionelle Charakterisierung enterischer Schaltkreise

### 4.2.1 Spontanmotilität

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Spontanmotilität von Zirkulär- und Längsmuskulatur, simultan gemessen am gleichen Gewebestück und im gleichen Beobachtungszeitraum, unter Kontrollbedingungen unterscheidet. Dazu wurden AUC sowie SD pro Messkanal und Apparatur jeweils über einen Zeitraum von 15 min ermittelt (Abb. 11 und 12). Weiterhin wurde untersucht, ob und wie sich die Spontanmotilität unter Hemmstoffeinfluss verändert. Ein Vergleich der Ergebnisse zwischen Apparatur 1 und Apparatur 2 sollte zeigen, welchen Einfluss die Messmethode auf die Ergebnisse hatte.



**Abb. 11: Erfassung der Spontanmotilität in Apparatur 1**

Die Messungen erfolgten an jeweils zwei Präparationen die in Zirkulär-(Bad 1 und 2) bzw. in Längsrichtung (Bad 3 und 4) fixiert waren. Der rote Kasten markiert einen 15-minütigen Zeitabschnitt. Die Berechnung der AUC und SD über diesen Zeitraum erfolgte für jeden Messkanal separat.



#### 4.2.1.2 Hemmstoffeinfluss

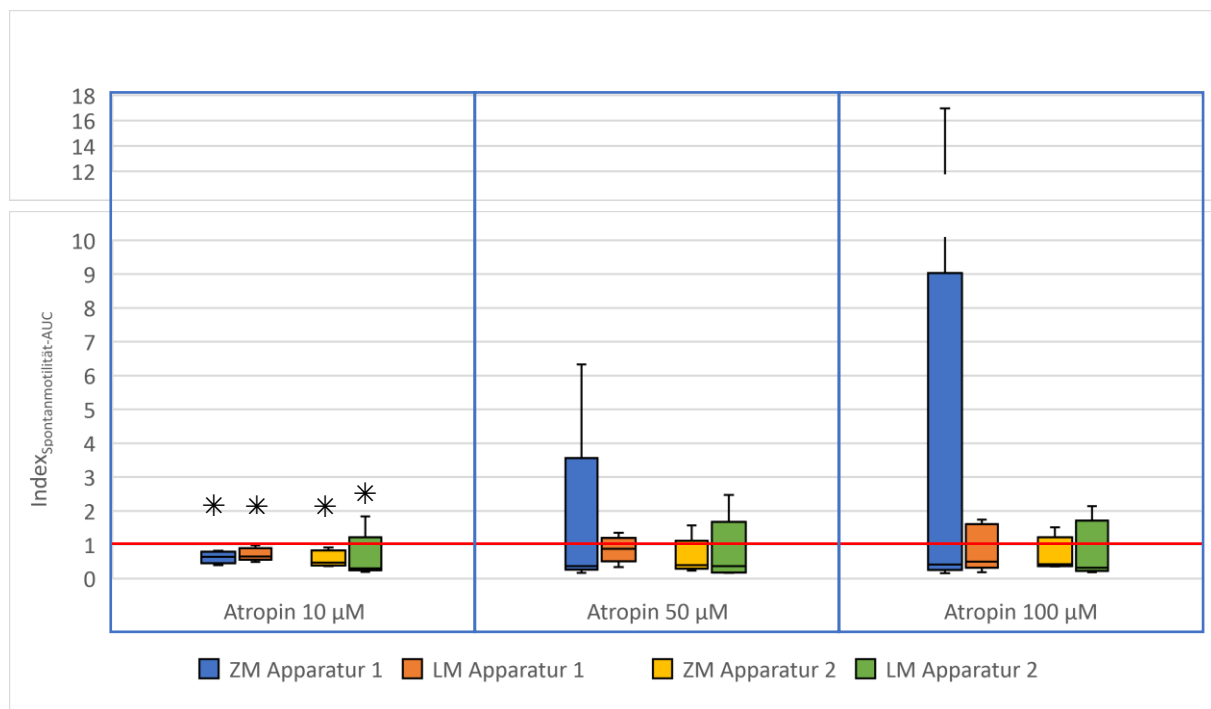
Zur Beurteilung der Wirkung eines Hemmstoffs wurde für jedes Präparat ein Quotient aus AUC bzw. SD unter Hemmstoffeinfluss und unter Kontrollbedingungen gebildet (siehe 3.3.3). Der so gewonnene Index ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$  bzw.  $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) beschreibt die Motilität nach Hemmstoffzugabe immer im Vergleich zur Motilität unter Kontrollbedingungen des entsprechenden Präparats. Ein Index  $<1$  zeigt einen hemmenden Einfluss eines Wirkstoffs, ein Index  $>1$  einen stimulierenden Einfluss.

##### Atropin

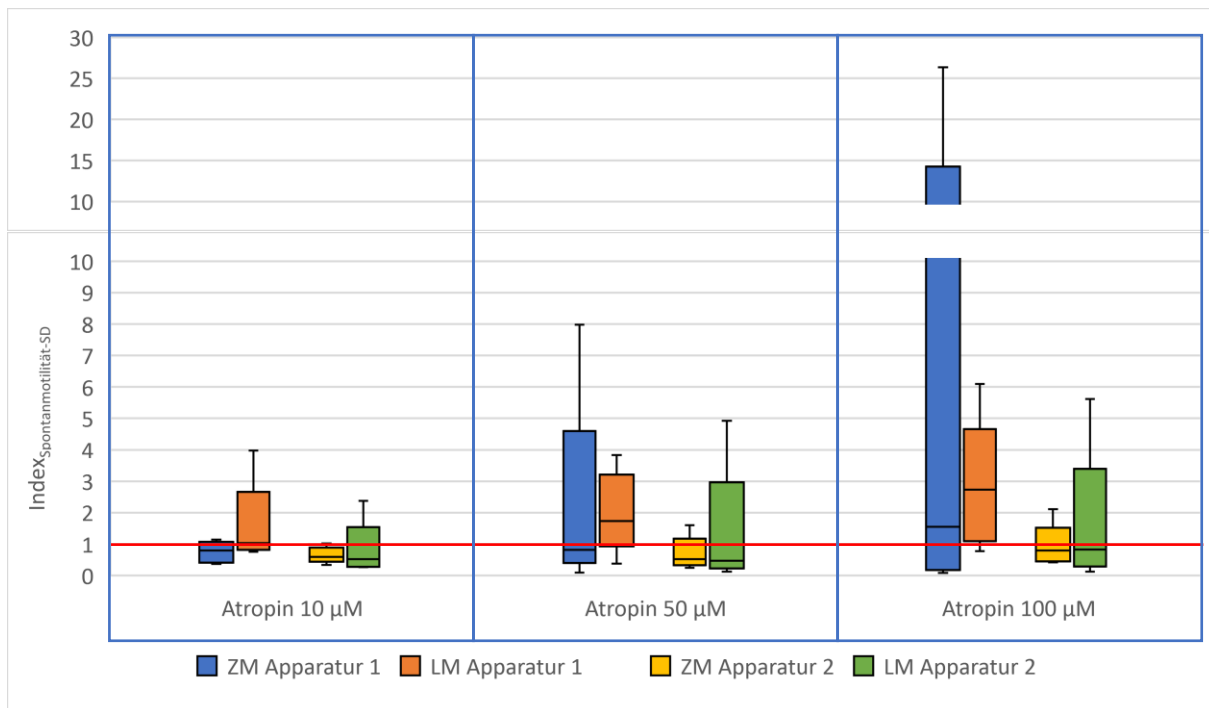
Atropin ist ein Hemmstoff für cholinerge muskarinerge und teilweise nikotinerge Rezeptoren (FREY 2009). Die Applikation von Atropin in den Dosierungen 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  sollte dazu dienen, abzugrenzen, zu welchen Anteilen die Spontanmotilität der Muskulatur direkt von cholinergen enterischen Nervenzellen oder von noch im Präparat vorhandenen parasymphischen Fasern moduliert wird.

Die Mediane der AUC-Indices waren unabhängig von der Muskulaturrichtung und der Messapparatur für alle eingesetzten Atropinkonzentrationen numerisch  $<1$ , was auf eine hemmende Wirkung von Atropin hinweist. Eine signifikante Hemmung konnte allerdings nur für eine Atropinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Abb. 15).

Die SD-Indices waren weder an der Zirkulär- noch an der Longitudinalmuskulatur signifikant unterschiedlich zu 1 (Abb. 8). Numerisch waren die Mediane für die an Apparatur 2 gewonnenen Messwerte der Indices für beide Muskulaturrichtungen und alle Atropinkonzentrationen  $<1$ . Mit Apparatur 1 gewonnene Messwerte ergaben hingegen für die Longitudinalmuskulatur Mediane der Indices, die bei allen Atropinkonzentrationen numerisch  $>1$  waren (Abb. 16).



**Abb. 15:** Index Spontanmotilität-AUC unter Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50 100  $\mu\text{M}$ ) an Apparatur 1 und 2 \* = signifikante Hemmung in Relation zur Kontrolle (p < 0,05) Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, N = 5.

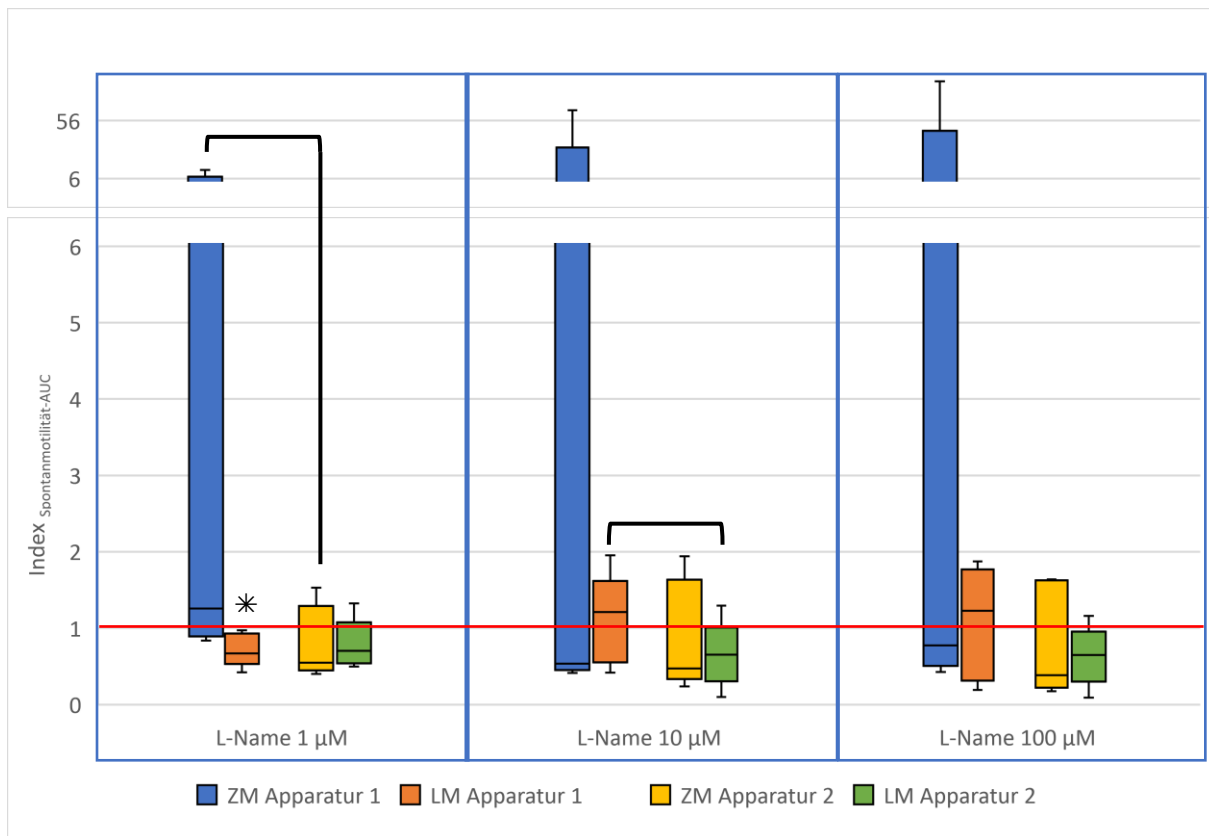


**Abb. 16: Index<sub>Spontanmotilität-SD</sub> unter Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50 100 µM) an Apparatur 1 und 2** Es konnten keine signifikante Veränderung im Index<sub>Spontan-SD</sub> durch Atropingabe festgestellt werden, Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, N = 5

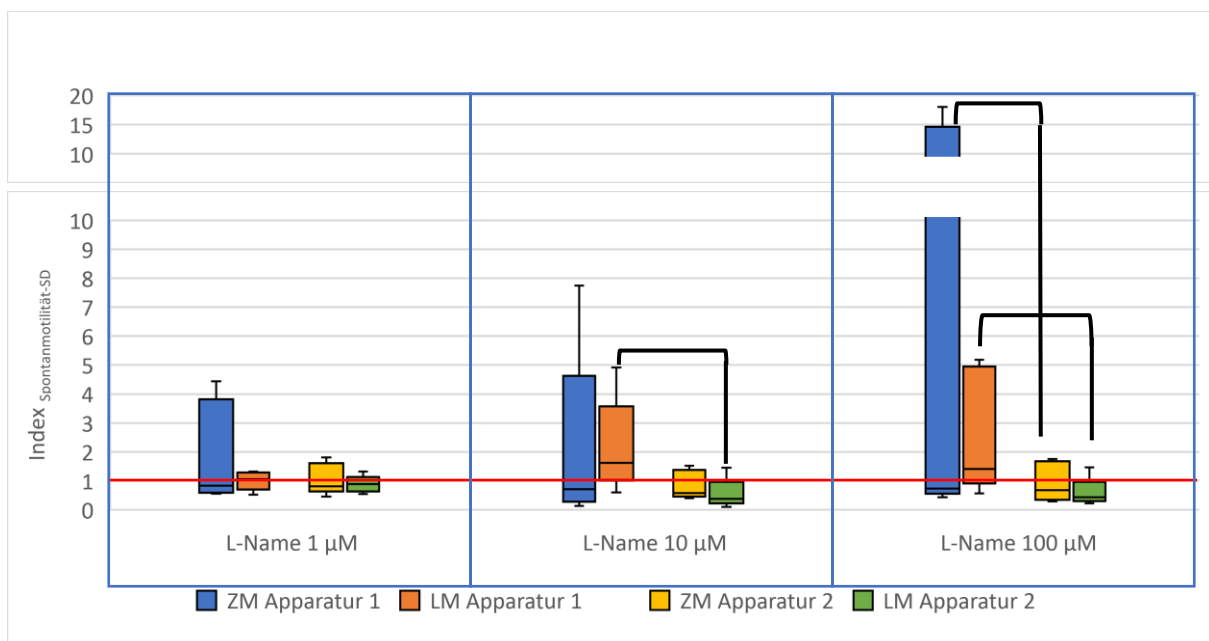
## L-Name

L-Name ist ein Hemmstoff der Stickstoffmonoxidsynthese (ALDERTON et al. 2001). Durch Inkubation der Gewebe mit L-Name kann darum eine Aussage getroffen werden, inwieweit im Gewebe gebildetes NO an der Kontrolle der Spontanmotilität beteiligt ist.

L-Name führte in der Apparatur 2 in allen Konzentrationsstufen für beide Zielparameter (AUC, SD) und beide Muskulaturrichtungen (ZM, LM) zu Indices, die zwar numerisch aber nicht signifikant  $<1$  waren (Abb. 9 und 10). An der LM in Apparatur 1 führte L-NAME in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  zu einem AUC Index, der signifikant  $<1$  war (Abb. 17). L-Name beeinflusste zudem die Motilität der LM in den beiden Apparaturen unterschiedlich, indem die Indices der LM von Apparatur 1 Werte  $>1$  und die der Apparatur 2 Werte  $<1$  aufwiesen. Für die AUC war dies in den Konzentrationen 10 und 100 µM der Fall, für die SD in allen Konzentrationsstufen. Dieser Unterschied war für die AUC in der Konzentration 10 µM und für die SD unter 10 und 100 µM L-Name signifikant (Abb. 17 und 18).



**Abb. 17: Index Spontanmotilität-AUC unter L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM) an Apparatur 1 und 2** \* = signifikanter Hemmstoffeffekt in Relation zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ) mit hemmender Wirkung, Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Klammer = signifikante Unterschiede zwischen Apparatur 1 und 2, Wilcoxon-Test. N = 5.

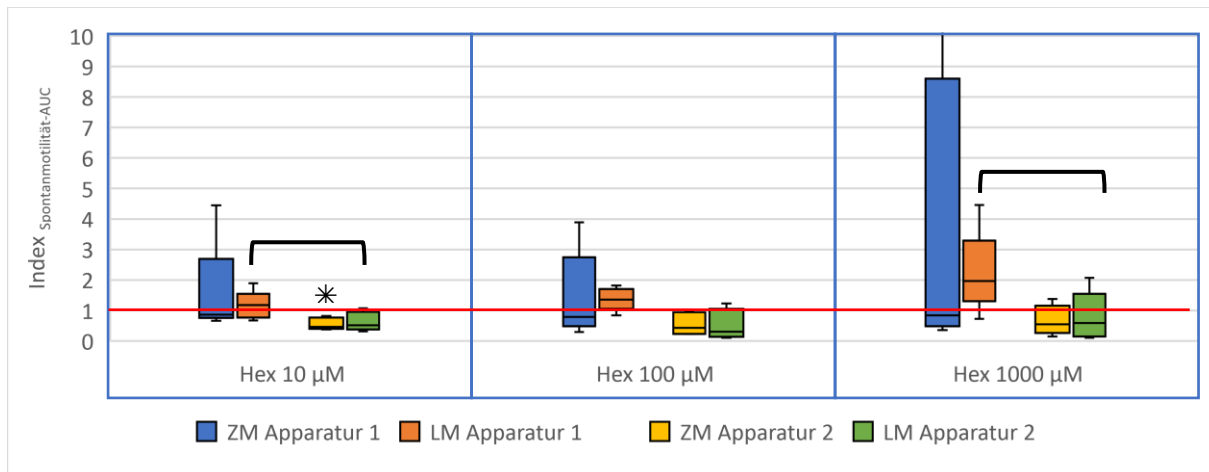


**Abb. 18: Index Spontanmotilität-SD unter L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM) an Apparatur 1 und 2** Klammer = signifikante Unterschiede zwischen Apparatur 1 und 2, Wilcoxon-Test. N = 5.

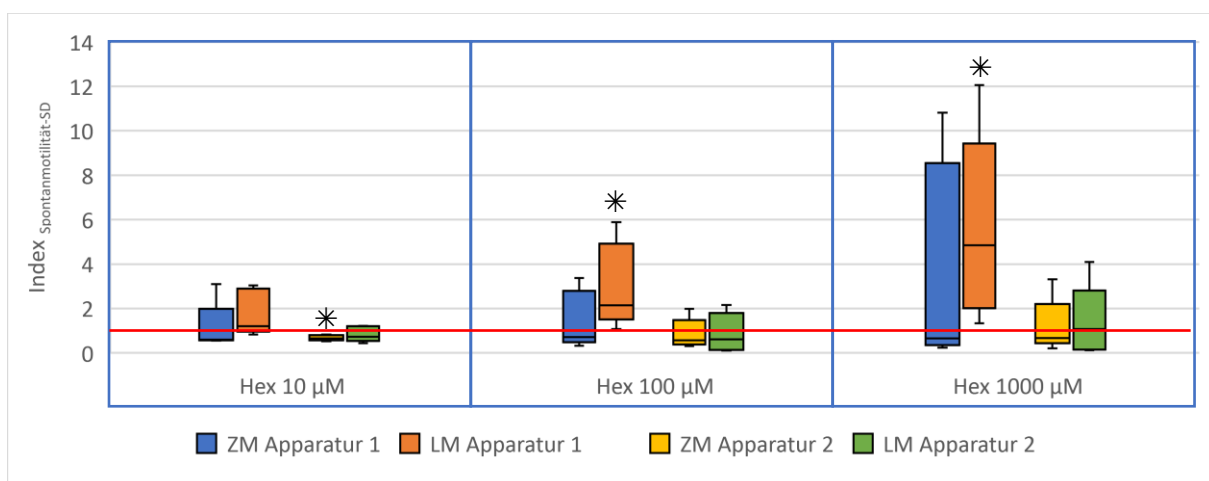
## Hexamethonium

Hexamethonium ist ein Hemmstoff für nikotinerge cholinerge Rezeptoren (FREY 2009). Die Applikation von Hexamethonium beeinflusst daher insbesondere eine mögliche Kommunikation zwischen enterischen Nervenzellen.

Nach Applikation von Hexamethonium waren die Indices der ZM für AUC und SD bei beiden Apparaturen im Median numerisch <1 (Abb. 19 und 20). Eine signifikante Verringerung von AUC und SD auf Werte <1 war aber nur für die Werte der Zirkulärmuskulatur aus Apparatur 2 nach der Applikation von 10µM Hexamethonium feststellbar (Abb. 19 und 20). Die Hexamethoniumapplikation beeinflusste die Motilität der Longitudinalmuskulatur in beiden Apparaturen unterschiedlich. In Apparatur 1 führte die Inkubation mit Hexamethonium zu Indices, die im Median numerisch >1 waren, die Mediane der Indices gemessen an Apparatur 2 waren hingegen weiterhin meist numerisch <1 (Abb. 19 und 20). Hexamethoniumkonzentrationen von 100 und 1000µM führten darüber hinaus an Apparatur 1 zu einer signifikanten Erhöhung der Indices auf Werte >1 für die SD (Abb. 11 und 12).



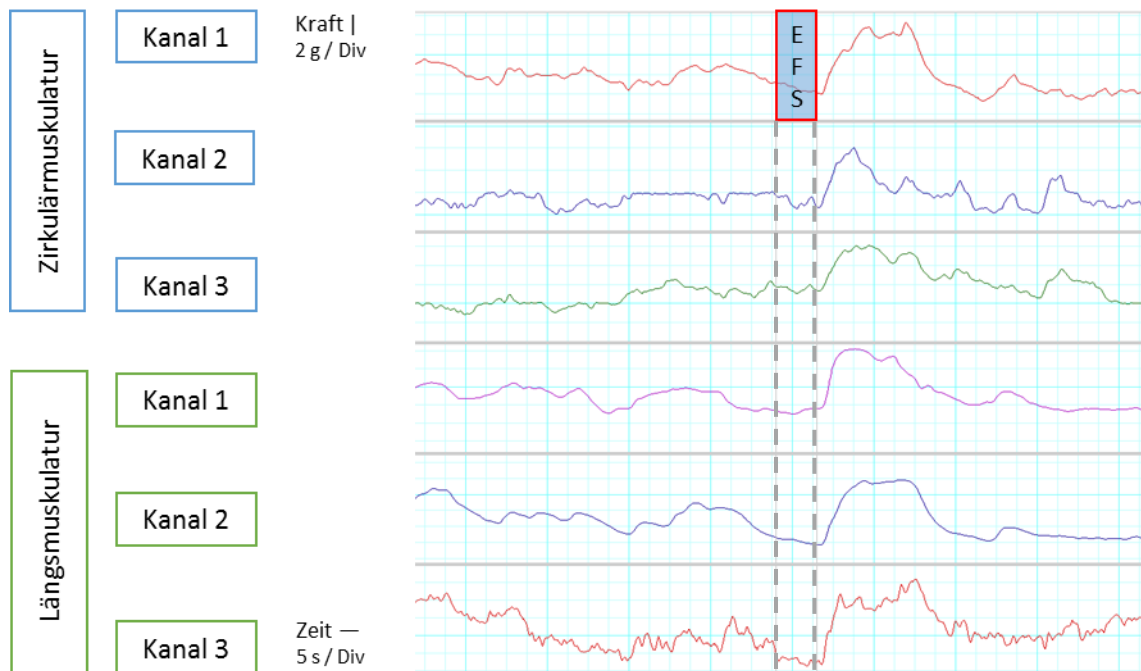
**Abb. 19: Index Spontanmotilität-AUC unter Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM) an Apparatur 1 und 2** \* = signifikanter Hemmstoffeffekt in Relation zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ), Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Klammer = signifikante Unterschiede zwischen Apparatur 1 und 2, Wilcoxon-Test. Hex = Hexamethonium, N = 5.



**Abb. 20: Index Spontanmotilität-SD unter Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM) an Apparatur 1 und 2** \* = signifikanter Hemmstoffeffekt in Relation zur Kontrolle ( $p < 0,05$ , Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Hex = Hexamethonium, N = 5 je Hemmstoff.

## 4.2.2 Nerv-Muskel-Antworten nach elektrischer Feldstimulation

### 4.2.2.1 Kontrollbedingungen



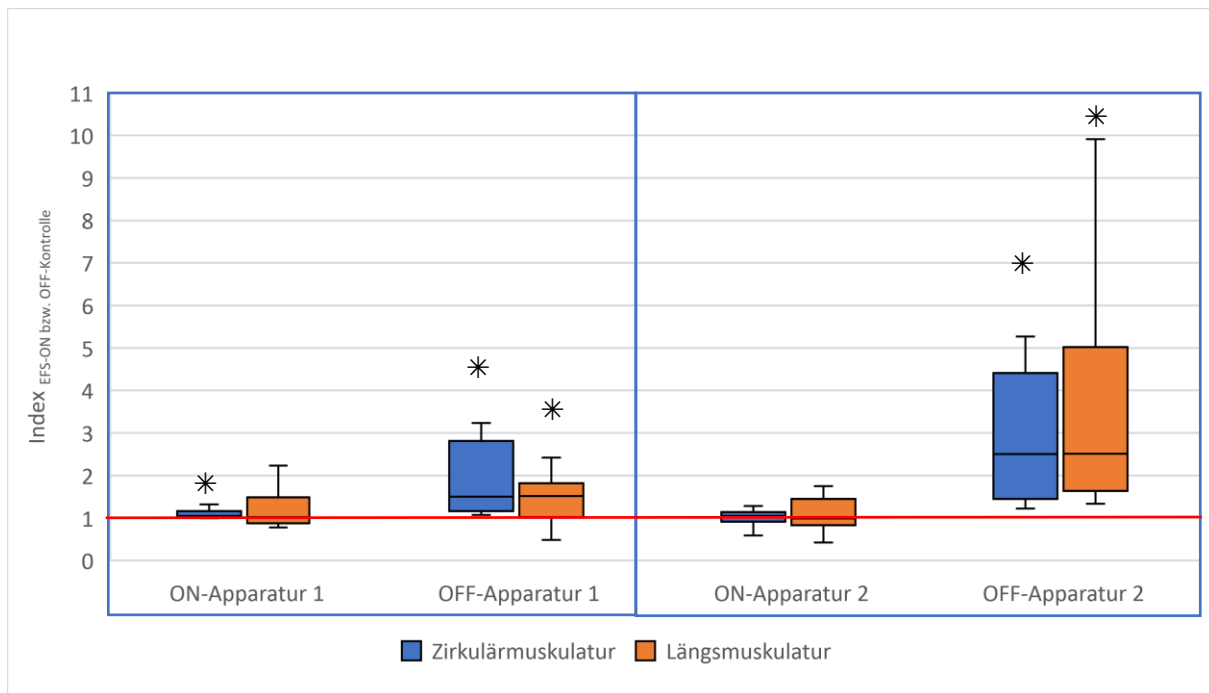
**Abb. 21: Messkurve, gemessen mit Apparatur 2 unter Kontrollbedingungen mit EFS**

Exemplarische Darstellung der Wirkung der EFS unter Kontrollbedingungen an Apparatur 2. EFS an Kanal 1, oral, ZM

#### 4.2.2.1.1 Einfluss der Messmethode

Während der elektrischen Feldstimulation wurde an Apparatur 1 eine geringgradige Motilitätssteigerung induziert ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Kontrolle}}$  signifikant  $>1$ ) (Abb. 22). In Apparatur 2 konnten an Zirkulär- oder Längsmuskulatur keine von der Spontanmotilität unterschiedlichen ON-Antworten registriert werden (Abb. 22). Unmittelbar nach der Stimulation kam es an beiden Apparaturen und Muskelrichtungen stets zu einer deutlichen Kontraktion (OFF-Antwort). Zwischen ZM und LM bestanden bezüglich der ermittelten Indices keine statistisch signifikanten Unterschiede. Beide Messapparaturen zeigen unter Kontrollbedingungen vergleichbare Ergebnisse (Abb. 22). Zur einheitlichen und besseren Vergleichbarkeit zwischen den beiden Messmethoden, wurden für die Gegenüberstellung von Apparatur 1 und 2 nur die Ergebnisse der EFS-Antworten aus Apparatur 2 verwendet, welche jeweils vom mittleren Kanal der ZM sowie LM stammten und dies bei medialem Stimulationsort. Diese Bedingungen betreffen im Folgenden alle aufgeführten Vergleiche zwischen Apparatur 1 und 2.



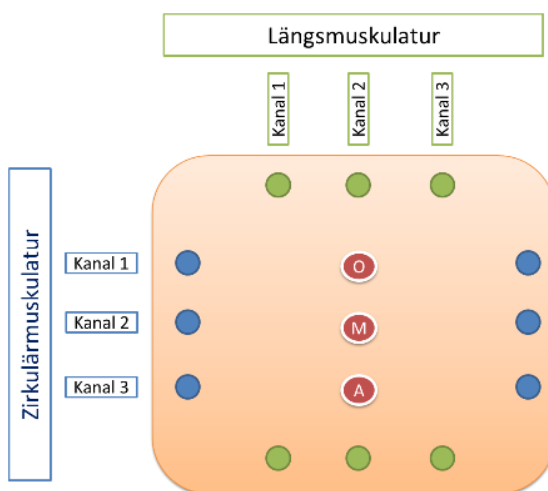


**Abb. 22: Index EFS-ON bzw. OFF-Kontrolle an Apparatur 1 und 2**

Index < 1 = hemmend (im Vergleich zur Spontanmotilität), Index > 1 = erregend. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*, Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . N=15.

#### 4.2.2.1.2 Einfluss des Stimulationsortes

Neben der Reaktion der Muskulatur direkt am Ort der EFS konnten in Apparatur 2 auch Muskelantworten an den dem Stimulationsort benachbarten Lokalisationen erfasst werden. Abb. 23 zeigt, in welcher räumlichen Beziehung die Stimulationsorte zur Muskulaturrichtung und deren Messkanälen standen.



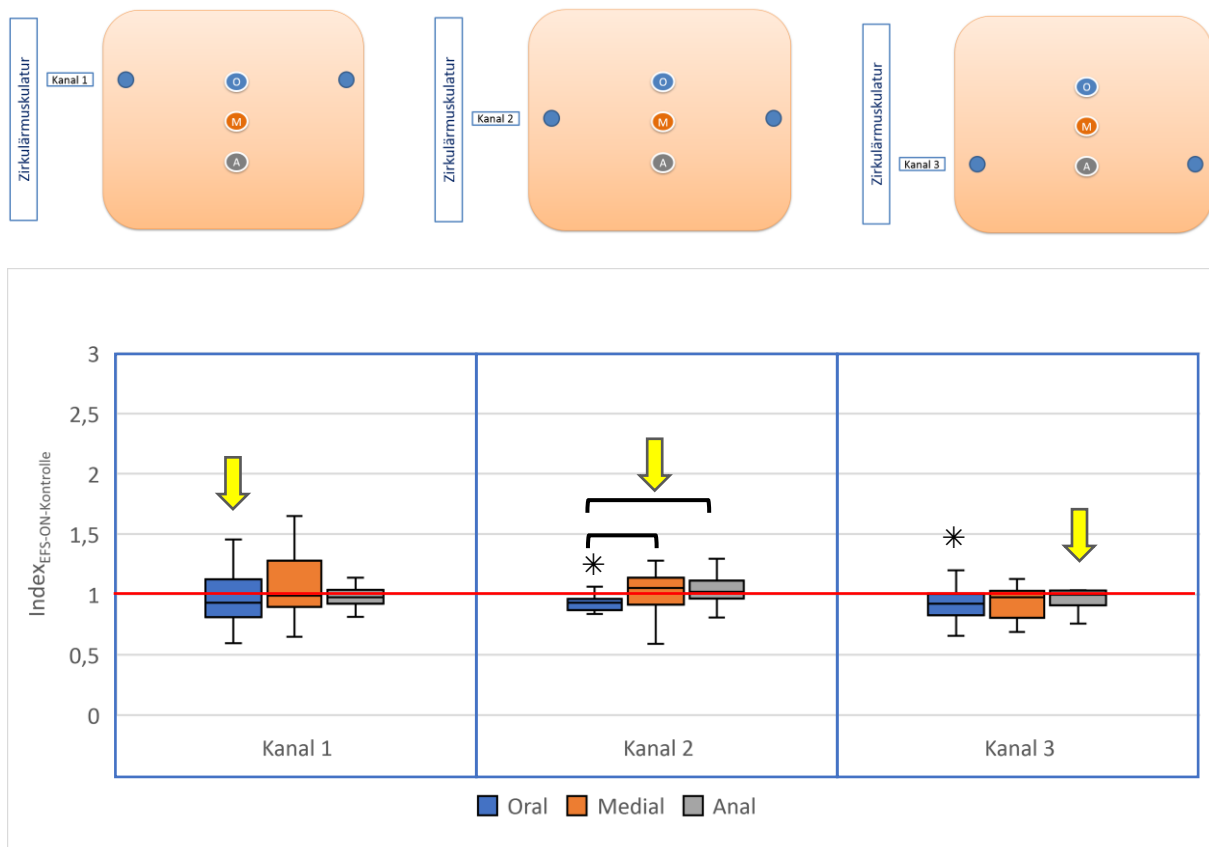
**Abb. 23: Darstellung der Stimulationsorte an Apparatur 2**

Rote Kreise kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode (oral (O), medial (M) und anal (A)). Die Stimulationsorte lagen entlang des Kanals 2 der Längsmuskulatur. Bezogen auf den Verlauf der Zirkulärmuskulatur war die orale Stimulation auf Höhe des Kanals 1, die mediale auf Höhe des Kanals 2 und die anale auf Höhe des Kanals 3 platziert.

## ON-Antworten

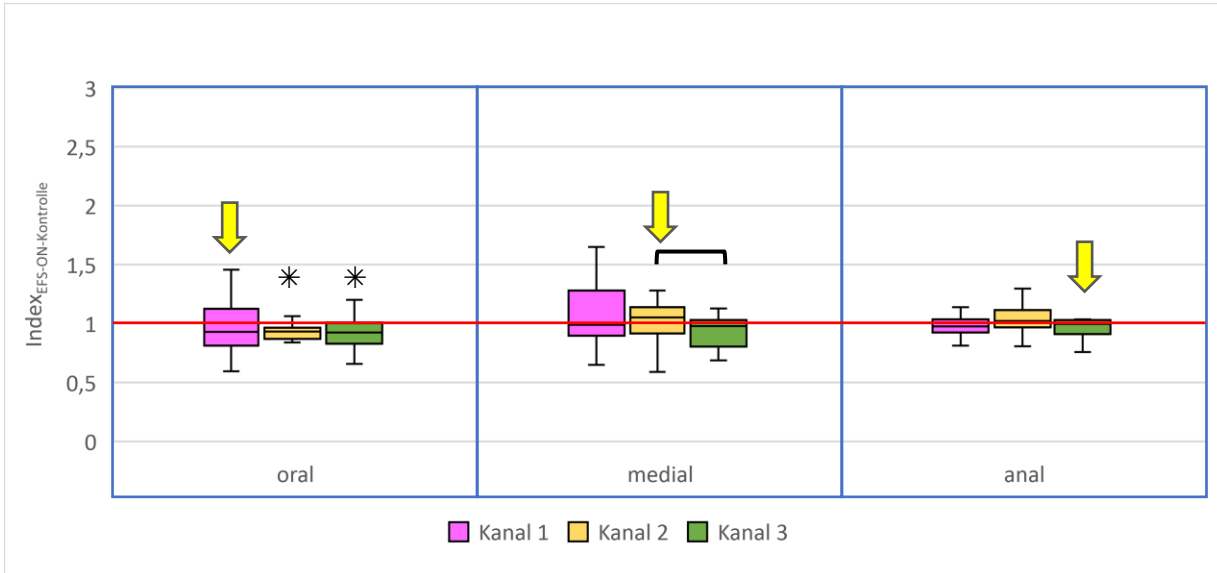
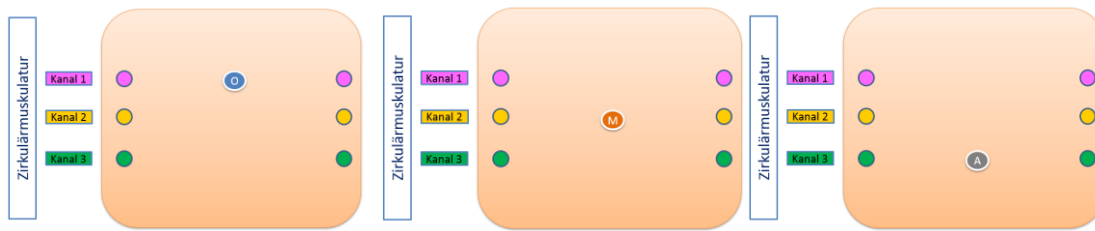
Abb. 24 zeigt separat für jeden Kanal der ZM den Index der ON-Antworten bei Stimulation an oraler, medialer und analer Position. In Abb. 25 sind die gleichen Ergebnisse, getrennt nach Stimulationsort dargestellt, um zu zeigen, wie sich die ZM an den drei Messkanälen zeitgleich während oraler, medialer oder analer Stimulation verhält.

An Kanal 1 waren während der EFS unabhängig von der Stimulationsstelle keine von der Spontanmotilität unterschiedlichen ON-Antworten registrierbar (Index nicht signifikant unterschiedlich zu 1). An Kanal 2 und 3 führte die Stimulation mit der oral gelegenen Elektrode zu einer signifikanten ON-Hemmung, d.h., die Muskulatur wurde anal des Stimulationsortes gehemmt (Index signifikant  $<1$  (Abb. 24 und 25). Die Stimulation in medialer Position führte aber zu keiner signifikanten Hemmung an Kanal 3 (Abb. 24). Allerdings war der Index bei medialer Stimulation an Kanal 3, also anal des Stimulationsortes signifikant geringer als direkt am Stimulationsort (Kanal 2) (Abb. 25).



**Abb. 24: Index<sub>EFS-ON-Kontrolle</sub> je Messkanal in Abhängigkeit vom Stimulationsort an der Zirkulärmuskulatur**

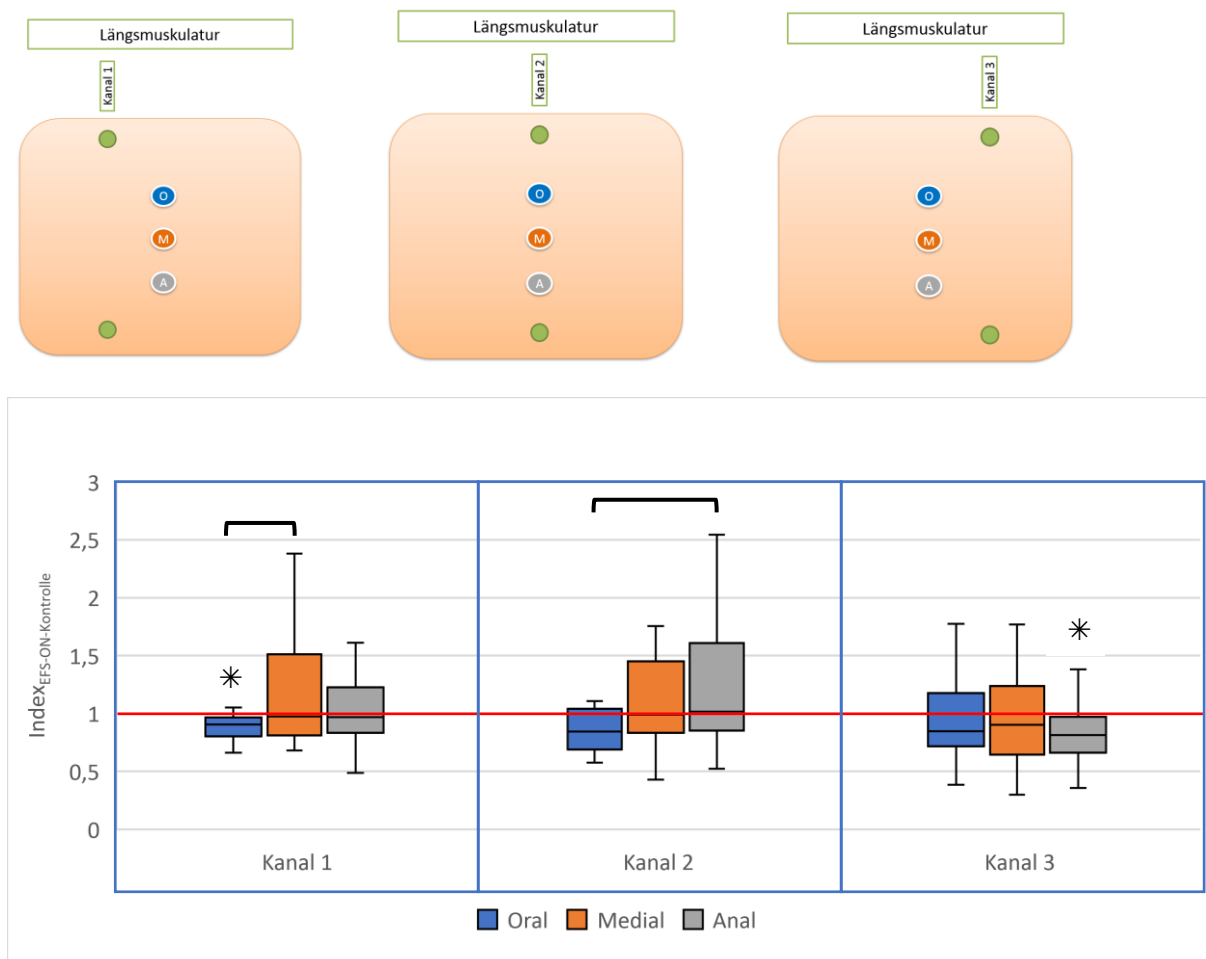
ON-Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Oral, Medial, Anal kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index  $<1$  = hemmend, Index  $>1$  = erregend. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsorten sind durch eine Klammer gekennzeichnet, Friedman-Test, Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni.  $N=15$ . Signifikanzniveau  $p < 0,05$



**Abb. 25:  $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Kontrolle}}$  je Stimulationsort in Abhängigkeit vom Messkanal an der Zirkulärmuskulatur**

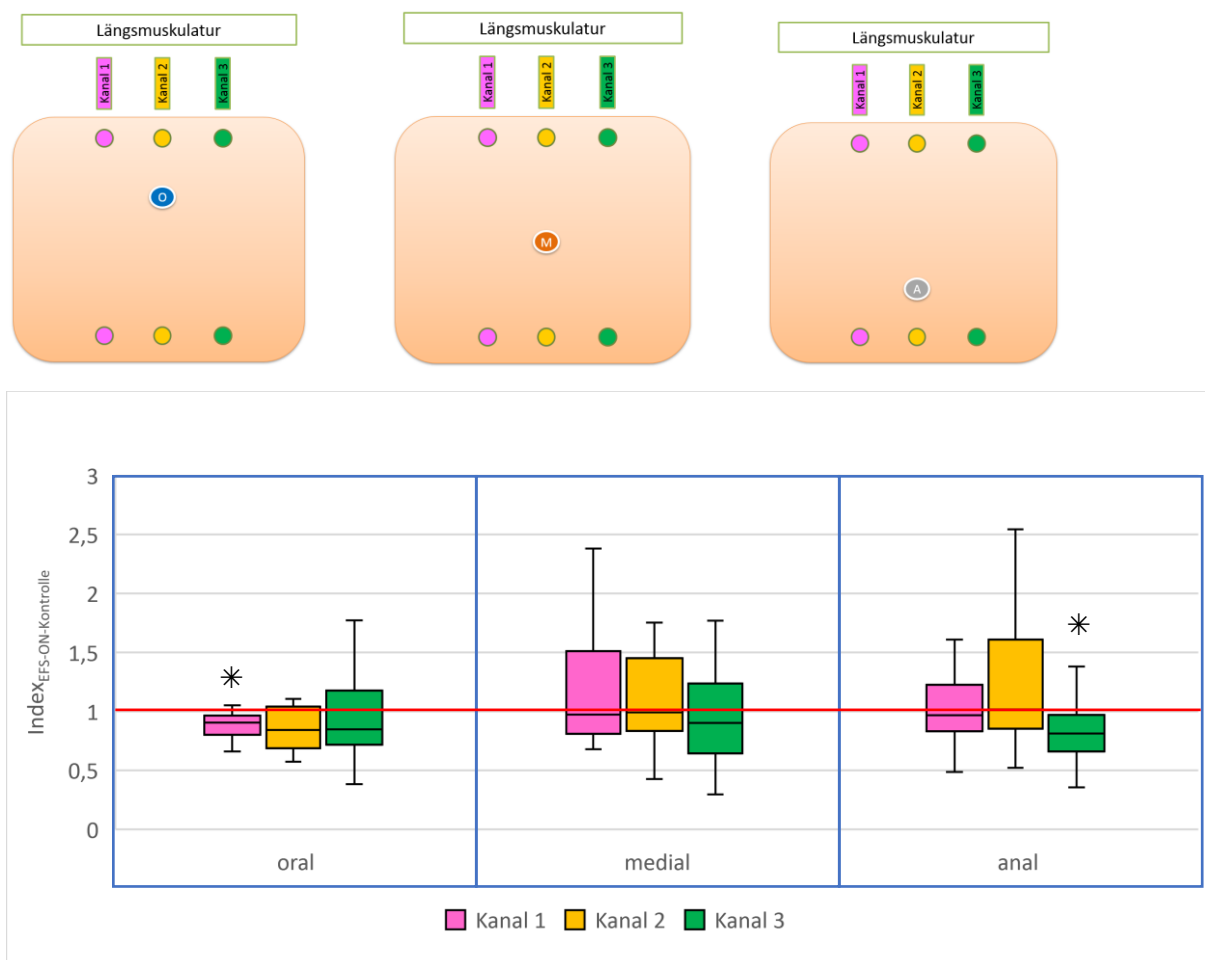
ON-Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Messkanal (Kanal 1, 2, 3). Oral, Medial, Anal kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Signifikante Unterschiede zwischen den Kanälen sind durch eine Klammer gekennzeichnet, Friedman-Test, Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni. N=15. Signifikanzniveau  $p < 0,05$

An der Längsmuskulatur wurde durch die vorgegebene Positionierung der Elektroden immer im Verlauf des Kanal 2 stimuliert (siehe Abb. 23). Vereinzelt konnten an den benachbarten Längsmuskelsträngen (Kanal 1 und 3) eine signifikante ON-Hemmung (Index für die ON-Antwort <1) gefunden werden (Abb. 26).



**Abb. 26: Index<sub>EFS-ON-Kontrolle</sub> je Messkanal in Abhängigkeit vom Stimulationsort an der Längsmuskulatur**

ON-Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Messkanal (Kanal 1, 2, 3). Oral, Medial, Anal kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsorten sind durch eine Klammer gekennzeichnet, Friedman-Test, Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni. N=15. Signifikanzniveau  $p < 0,05$

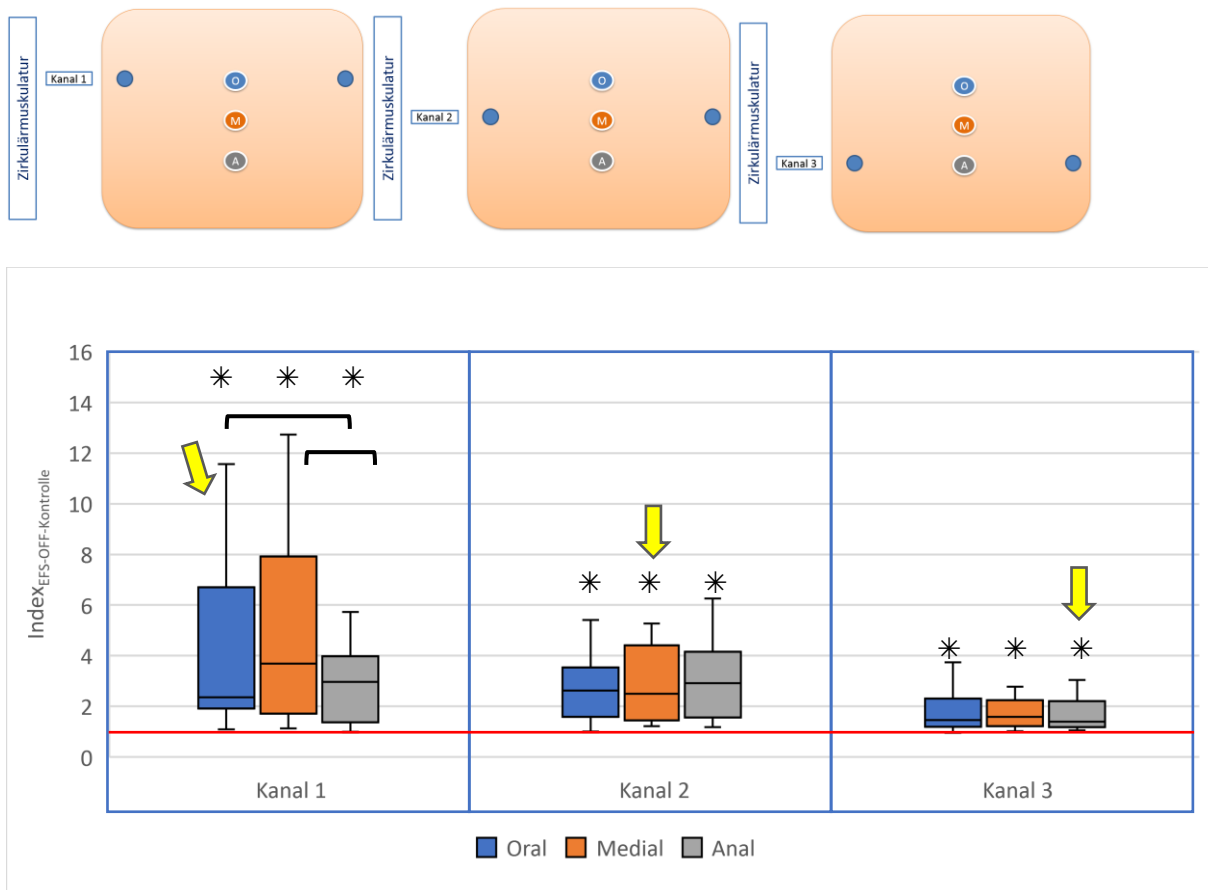


**Abb. 27: Index<sub>EFS-ON-Kontrolle</sub> je Stimulationsort in Abhängigkeit vom Messkanal an der Längsmuskulatur**

ON-Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Messkanal (Kanal 1, 2, 3). Oral, Medial, Anal kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test. N=15. Signifikanzniveau  $p < 0,05$

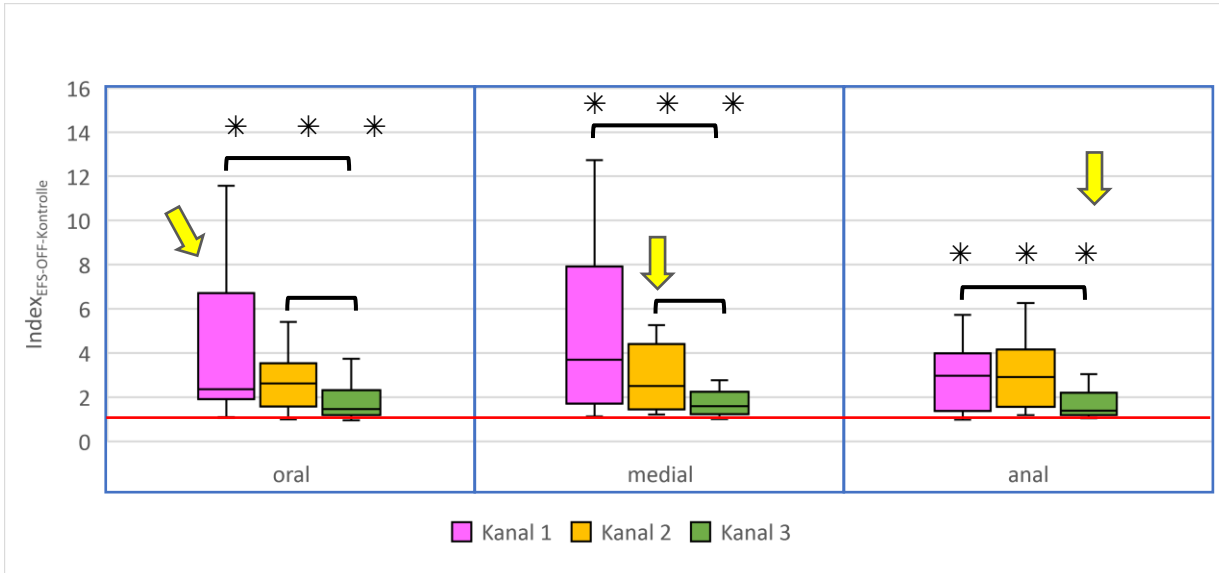
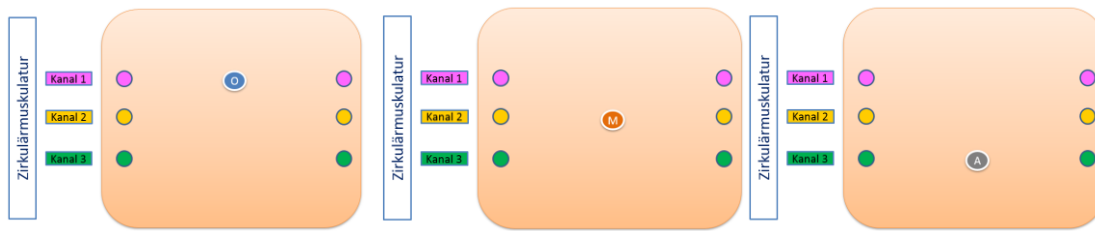
Genauso wie die ON-Antworten wurden auch die OFF-Antworten nach Messkanal bzw. Stimulationsort getrennt dargestellt. Abb. 28 zeigt den Einfluss des Stimulationsortes auf den Index<sub>EFS-OFF-Kontrolle</sub> der OFF-Antworten an der ZM separat für jeden Kanal. In Abb. 29 ist dargestellt, wie sich die gemessenen Werte zeitgleich während oraler, medialer oder analer Stimulation an den drei benachbarten Messkanälen der ZM verhalten.

An allen Messkanälen (Kanal 1-3) kam es unabhängig von der Stimulationsstelle unmittelbar nach der EFS zu einer deutlichen Kontraktion (Index der OFF-Antworten >1) (Abb. 28 und 29). Für Kanal 1 betrachtet, hat die räumliche Position der Stimulationselektrode einen signifikanten Einfluss auf die Mediane der Indices der OFF-Antwort (Abb. 28). So war beispielsweise der Index der an Kanal 1 aufgezeichneten Antworten bei Stimulation an analer Position signifikant größer als bei Stimulation an oraler Position. Diese höhere OFF-Antwort nach Stimulation anal des Messpunktes ließ sich allerdings für den Kanal 2 nicht nachweisen. An Kanal 2 und 3 war vielmehr die Größe der OFF-Antwort nicht vom Stimulationsort abhängig (Abb. 28). Abb. 29 zeigt, dass nach oraler, medialer und analer Stimulation sich die zeitgleich erhobenen Indices der einzelnen Kanäle im Median signifikant voneinander unterscheiden. Nach medialer Stimulation waren die Indices im Median oral (Kanal 1) signifikant höher als anal (Kanal 3). Anal (Kanal 3) waren auch bei medialer Stimulation die Indices signifikant niedriger als an den beiden anderen Kanälen.



**Abb. 28: Index<sub>EFS-OFF-Kontrolle</sub> je Messkanal in Abhängigkeit vom Stimulationsort an der Zirkulärmuskulatur**

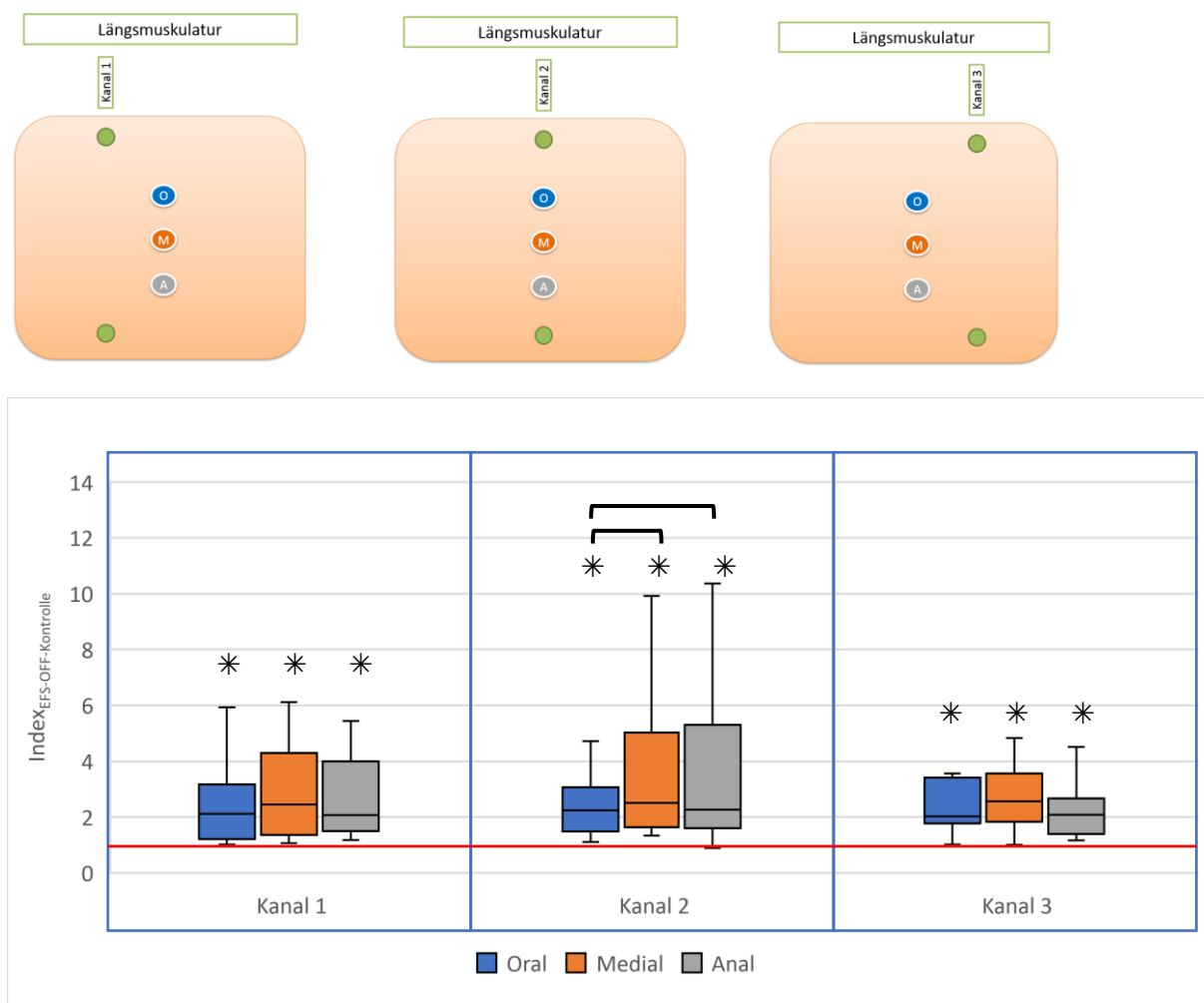
OFF-Antworten der drei benachbarten Bereiche (Kanal 1, 2, 3) der Zirkulärmuskulatur jeweils in Abhängigkeit zum Stimulationsort. Oral, Medial, Anal kennzeichnet jeweils den Stimulationsort. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsorten sind durch eine Klammer gekennzeichnet, Friedman-Test, Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni. N=15. Signifikanzniveau  $p < 0,05$



**Abb. 29: Index<sub>EFS-OFF-Kontrolle</sub> je Stimulationsort in Abhängigkeit vom Messkanal an der Zirkulärmuskulatur**

OFF-Antworten der drei Stimulationsorte (Oral, Medial, Anal) jeweils in Abhängigkeit zum Messkanal (Kanal 1, 2, 3) der Zirkulärmuskulatur. Oral, Medial, Anal kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Signifikante Unterschiede zwischen den Kanälen sind durch eine Klammer gekennzeichnet, Friedman-Test, Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni. N=15. Signifikanzniveau  $p < 0,05$

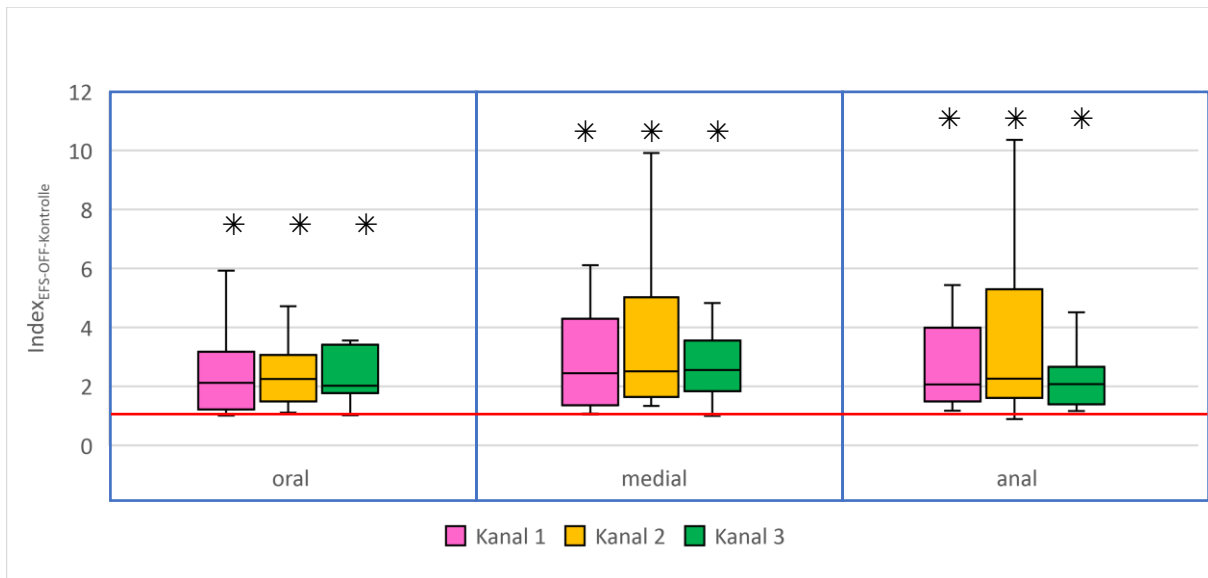
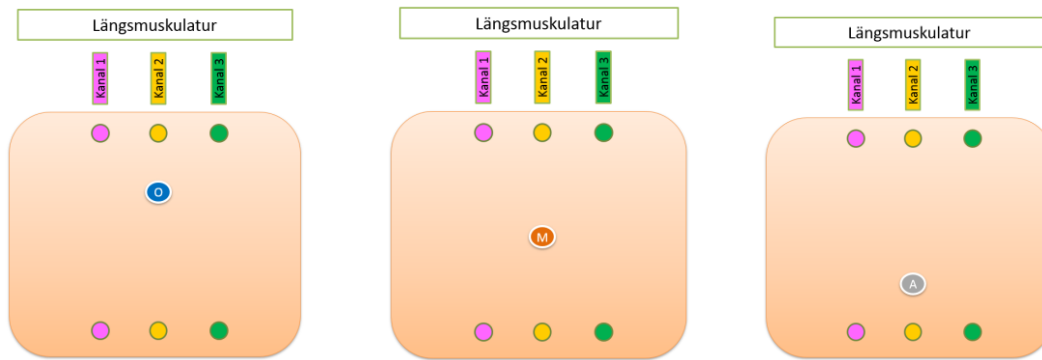
An allen Messkanälen der Längsmuskulatur wurden für die OFF-Antworten Indices ermittelt, die signifikant >1 waren (Abb. 30 und 31). Bei der Längsmuskulatur gab es in der OFF-Antwort an Kanal 2 signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Position der EFS (Abb. 30).



**Abb. 30:  $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Kontrolle}}$  je Stimulationsort in Abhängigkeit vom Messkanal an der Längsmuskulatur**

OFF-Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Messkanal (Kanal 1, 2, 3). Oral, Medial, Anal kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsorten sind durch eine Klammer gekennzeichnet, Friedman-Test, Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni. N=15. Signifikanzniveau  $p < 0,05$



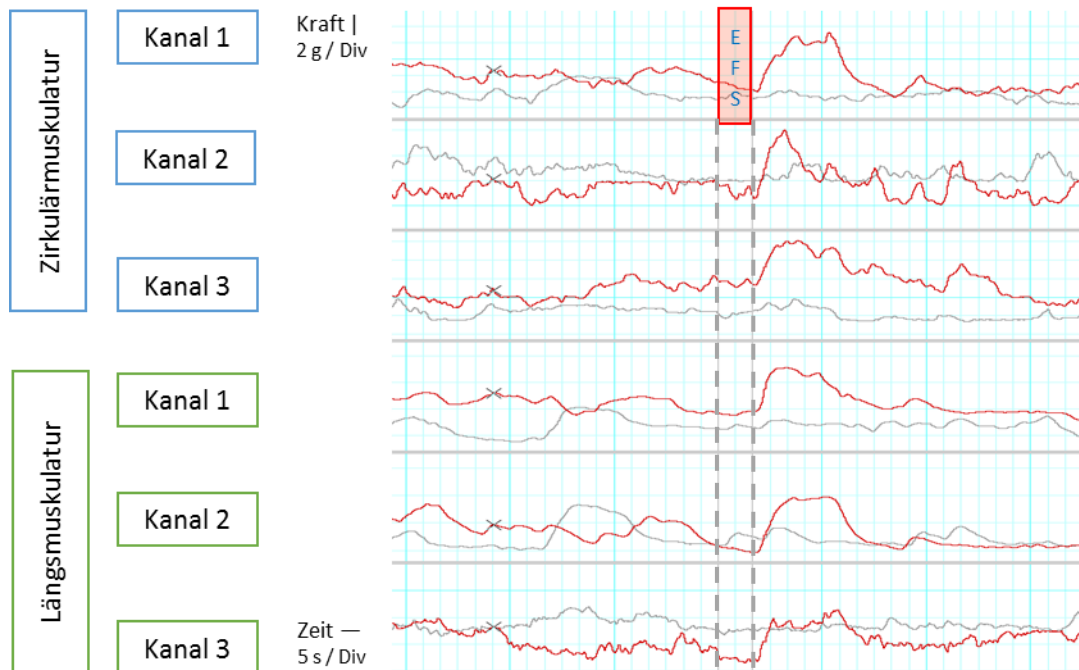


**Abb. 31:  $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Kontrolle}}$  je Stimulationsort in Abhängigkeit vom Messkanal an der Längsmuskulatur**

ON-Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Messkanal (Kanal 1, 2, 3). Oral, Medial, Anal kennzeichnen die Position der Stimulationselektrode. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest. N=15. Signifikanzniveau  $p < 0,05$

#### 4.2.2.2 Hemmstoffeinfluss

##### 4.2.2.2.1 Atropin



**Abb. 32: Original Messkurve an Apparatur 2 unter Kontrollbedingungen (rote Kurve) und Atropin-Einfluss, 10 µM (graue Kurve)** Exemplarische Darstellung zweier Originalmesskurven, aufgenommen mit Apparatur 2. Rote Kurve = unter Kontrollbedingungen, graue Kurve = unter Atropin-Einfluss 10µM. EFS an Kanal 1, oral, Zirkulärmuskulatur

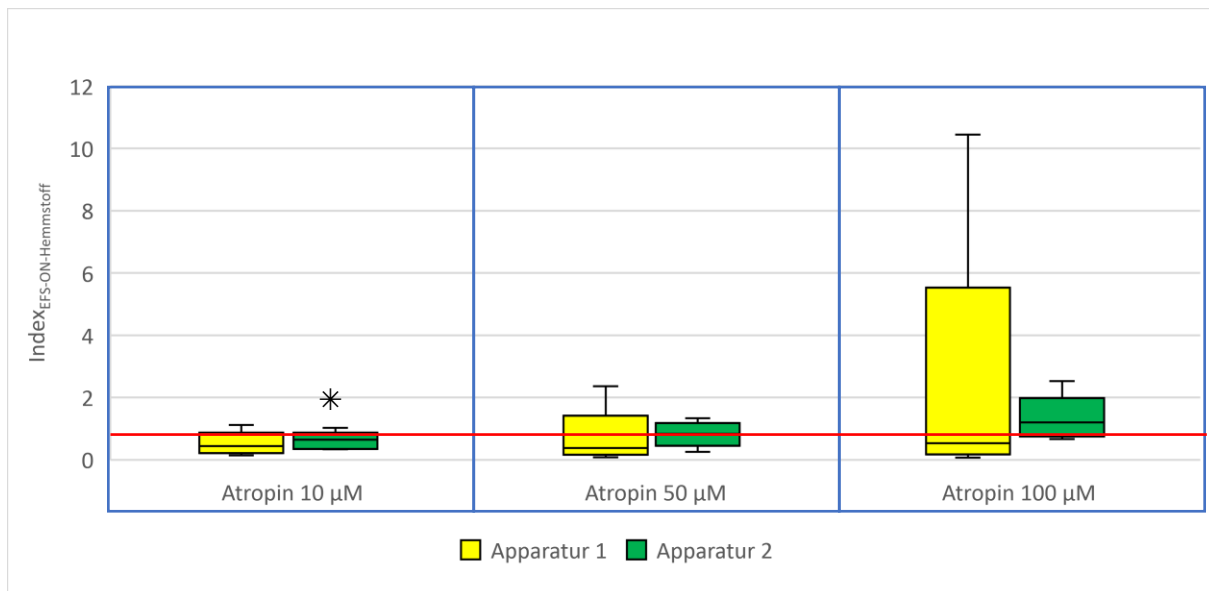
##### 4.2.2.2.1.1 Einfluss der Messmethode

Vorbemerkung: Zur einheitlichen und besseren Vergleichbarkeit zwischen den beiden Messmethoden, wurden für die Gegenüberstellung von Apparatur 1 und 2 nur die Ergebnisse der EFS-Antworten aus Apparatur 2 verwendet, welche jeweils vom mittleren Kanal der ZM sowie LM stammten und dies bei medialem Stimulationsort.

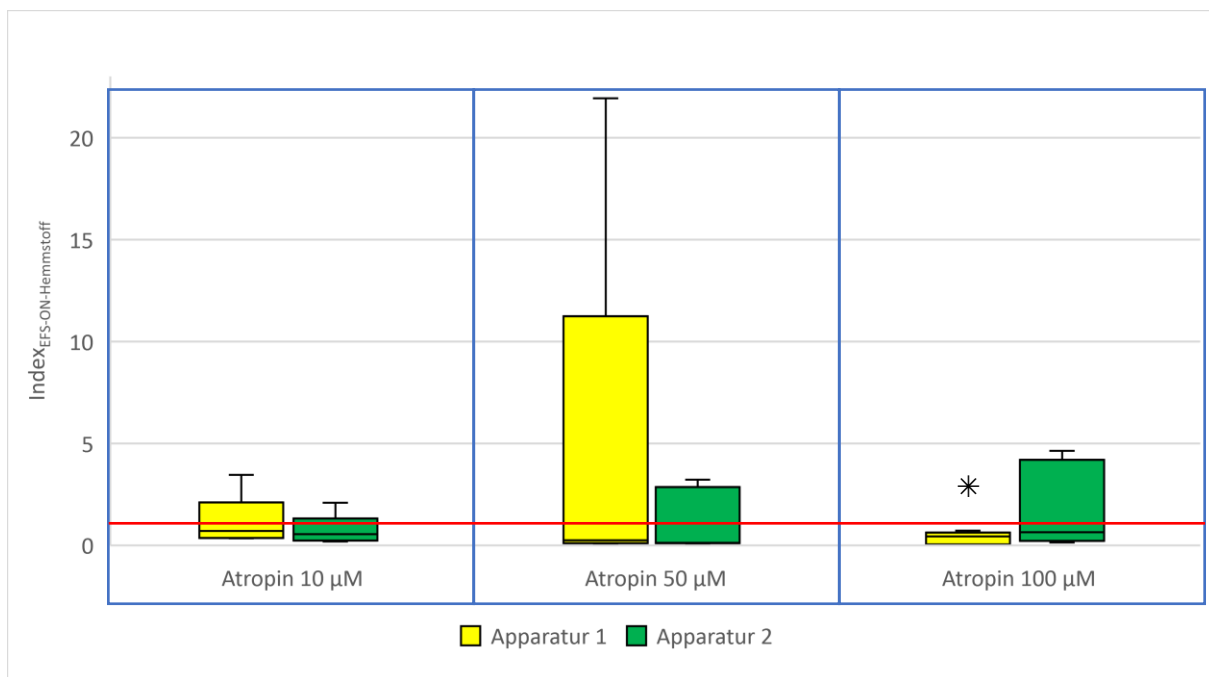
##### ON-Antwort

Atropingabe führte zu Indices der ON-Antworten, die numerisch  $<1$  waren bei beiden Muskelschichten und beiden Apparaturen, ausgenommen des Index an Apparatur 2 unter 100µM Atropin (Index  $>1$ ). Eine statistisch signifikante Verringerung des Index zeigte sich aber nur nach Applikation von 100µM Atropin an der Längsmuskulatur in Apparatur 1 (Abb. 33).

Zwischen den Messmethoden bestanden für die Indices der ON-Antworten unter Atropin-Einfluss keine signifikanten Unterschiede (Abb. 33 und 34).



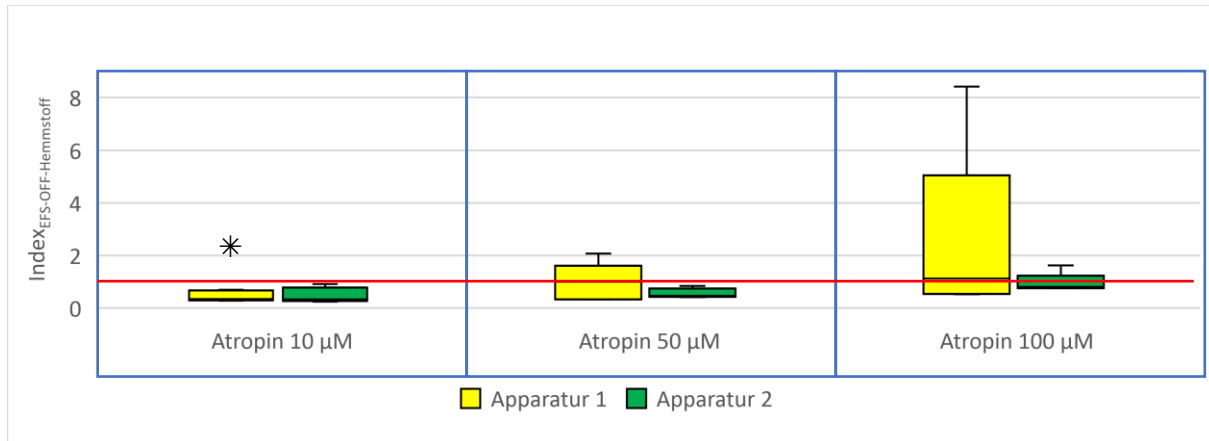
**Abb. 33: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2.** Dargestellt sind die Indices der AUC der ON-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) unter Atropin Einfluss an der Zirkulärmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .



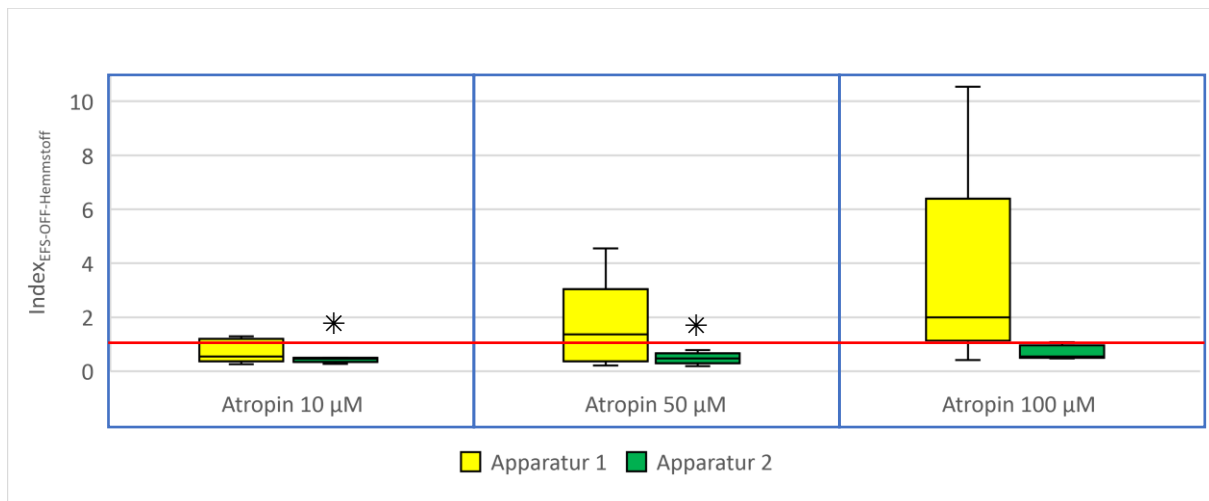
**Abb. 34: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die ON Antworten der Längsmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2.** Dargestellt sind die Indices der AUC der ON-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) unter Atropin Einfluss an der Längsmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .

## OFF-Antwort

In Apparatur 1 konnten an der ZM die durch EFS hervorgerufenen Kontraktionen nur durch 10µM Atropin signifikant gehemmt werden (Index signifikant <1, Abb. 35). An der LM führte Atropin in einer Konzentration von 10µM und 50µM zu einer signifikanten Hemmung der OFF-Antworten (Kontraktionen) in Apparatur 2 (Index signifikant <1, Abb. 36). Atropin schien die gemessenen OFF-Antworten der Längsmuskulatur je nach Apparatur unterschiedlich zu beeinflussen. An Apparatur 2 waren die Indices für die OFF-Antworten nach Atropin-Applikation numerisch <1, wo hingegen an Apparatur 1 im Median eine Erhöhung der Indices (>1) feststellbar war. Diese scheinbaren Unterschiede zwischen den beiden Messmethoden waren jedoch nicht signifikant (Abb. 35 und 36).



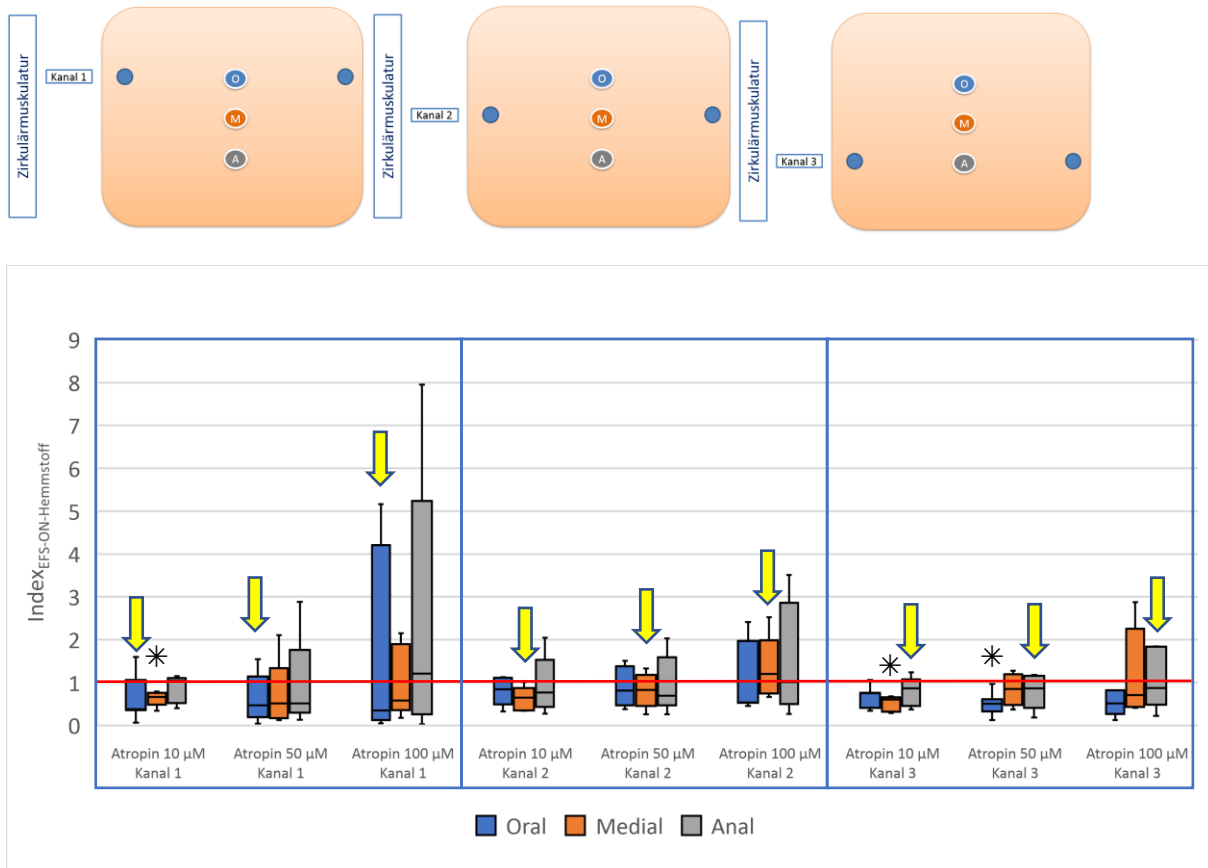
**Abb. 35: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2.** Dargestellt sind die Indices der AUC der OFF-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) unter Atropin Einfluss an der Zirkulärmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .



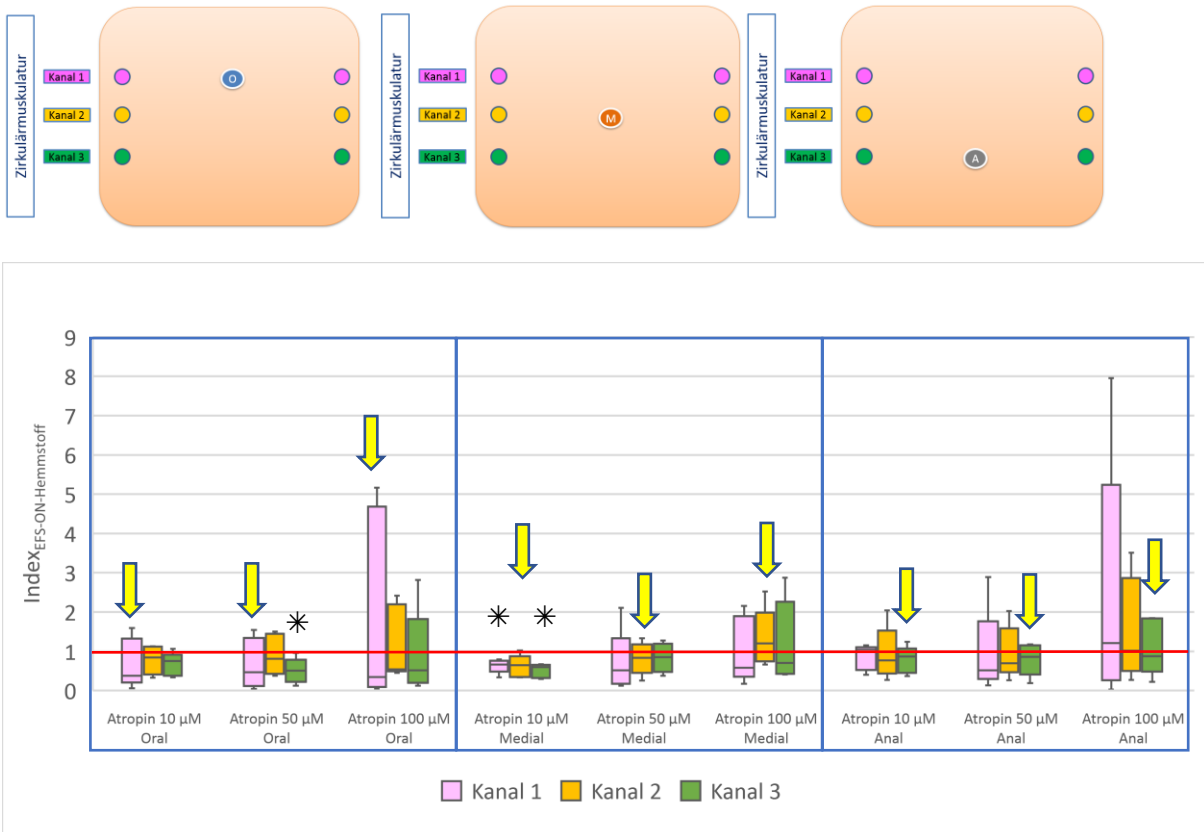
**Abb. 36: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die OFF Antworten der Längsmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2.** Dargestellt sind die Indices der AUC der OFF-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) unter Atropin Einfluss an der Längsmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .

#### 4.2.2.2.1.2 Einfluss des Stimulationsortes

Die ON und OFF-Antworten der ZM waren unter Atropin-Einfluss entweder gleich oder signifikant geringer als unter Kontrollbedingungen (Abb. 37 und 38, sowie 41 und 42). Eine Verringerung der OFF-Antworten (Index <1) konnte durch Atropinkonzentrationen von 10 und 50  $\mu\text{M}$ , aber nicht durch 100  $\mu\text{M}$  Atropin induziert werden. Unter Atropin hatte – anders als unter Kontrollbedingungen, siehe 4.2.2.1.2- der Stimulationsort keinen Einfluss auf die ON- und Off-Antworten.

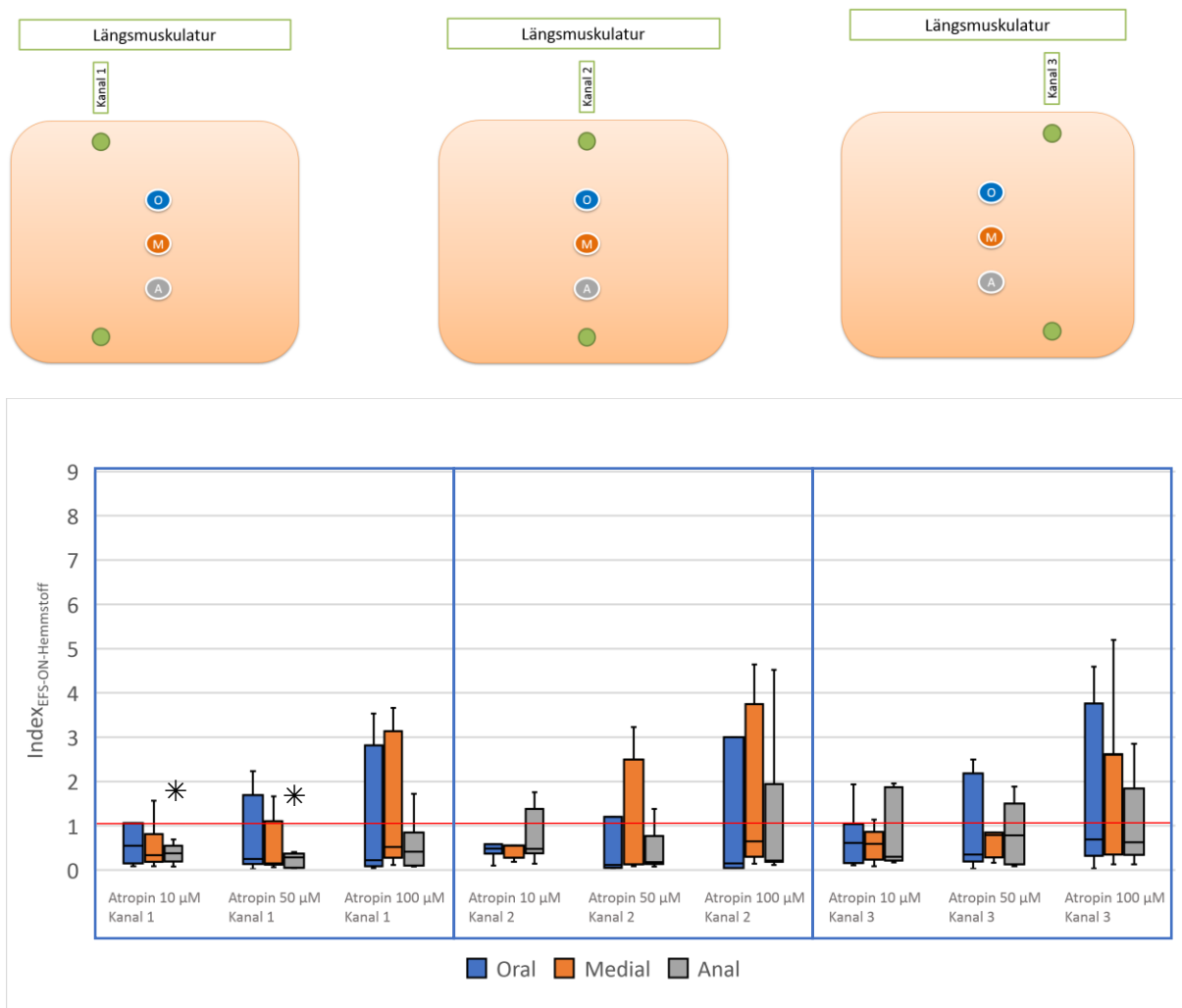


**Abb. 37: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropin-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**

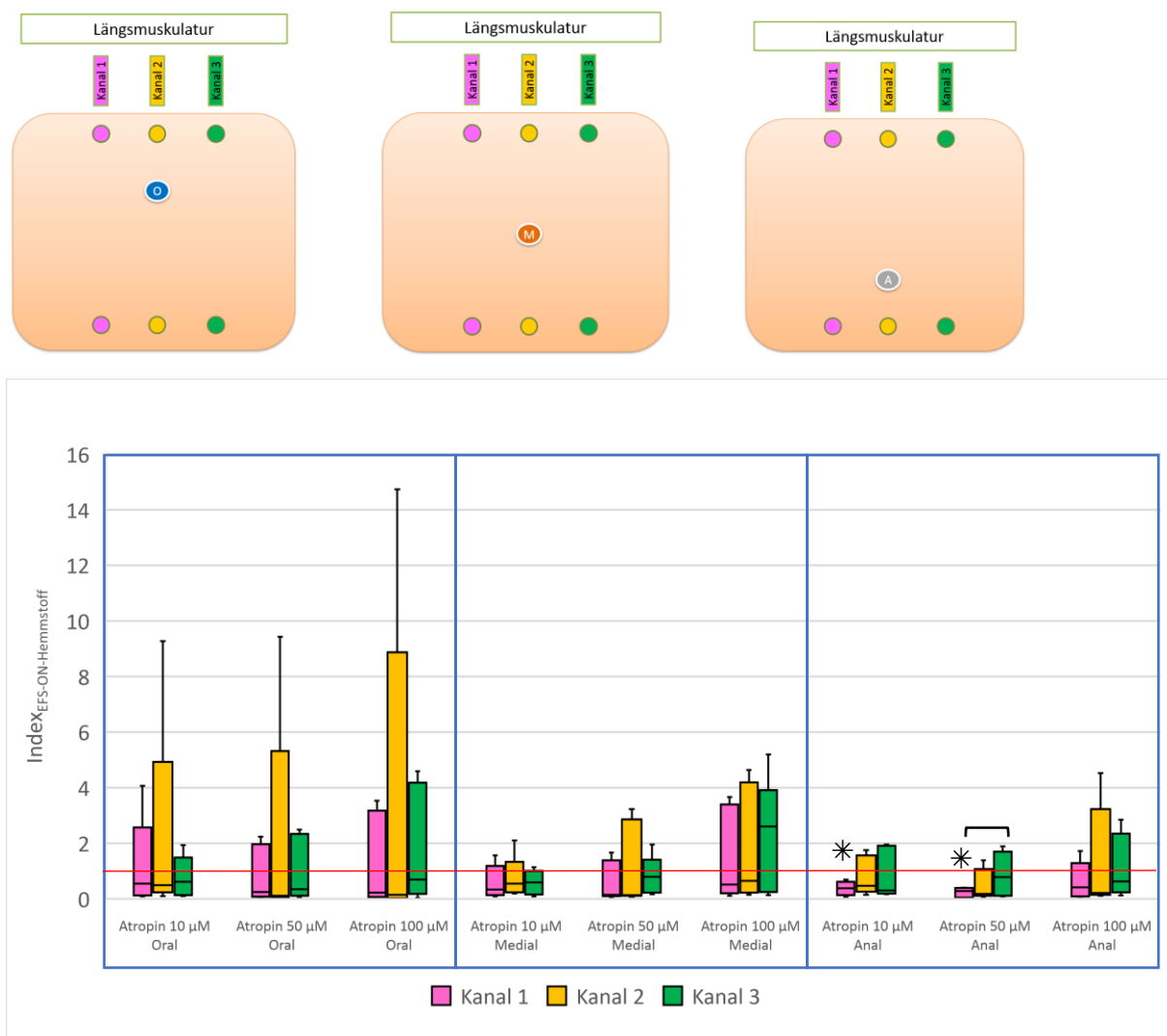


**Abb. 38: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort.** Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropinkonzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.

Bei den ON-Antworten der LM zeigte sich, dass es unter 50µM Atropin bei analem Stimulationsort signifikante Unterschiede im Median der Indices zwischen den Messkanälen gab, insbesondere bei den Werten die an Kanal 1 und 3 abgegriffen wurden (Abb. 39). Desweiteren konnte für die Indices der OFF-Antworten an Kanal 2 und 3 der LM unter 50µM Atropin eine signifikante Abhängigkeit zum Stimulationsort nach Friedmann-Test festgestellt werden (Abb. 40).

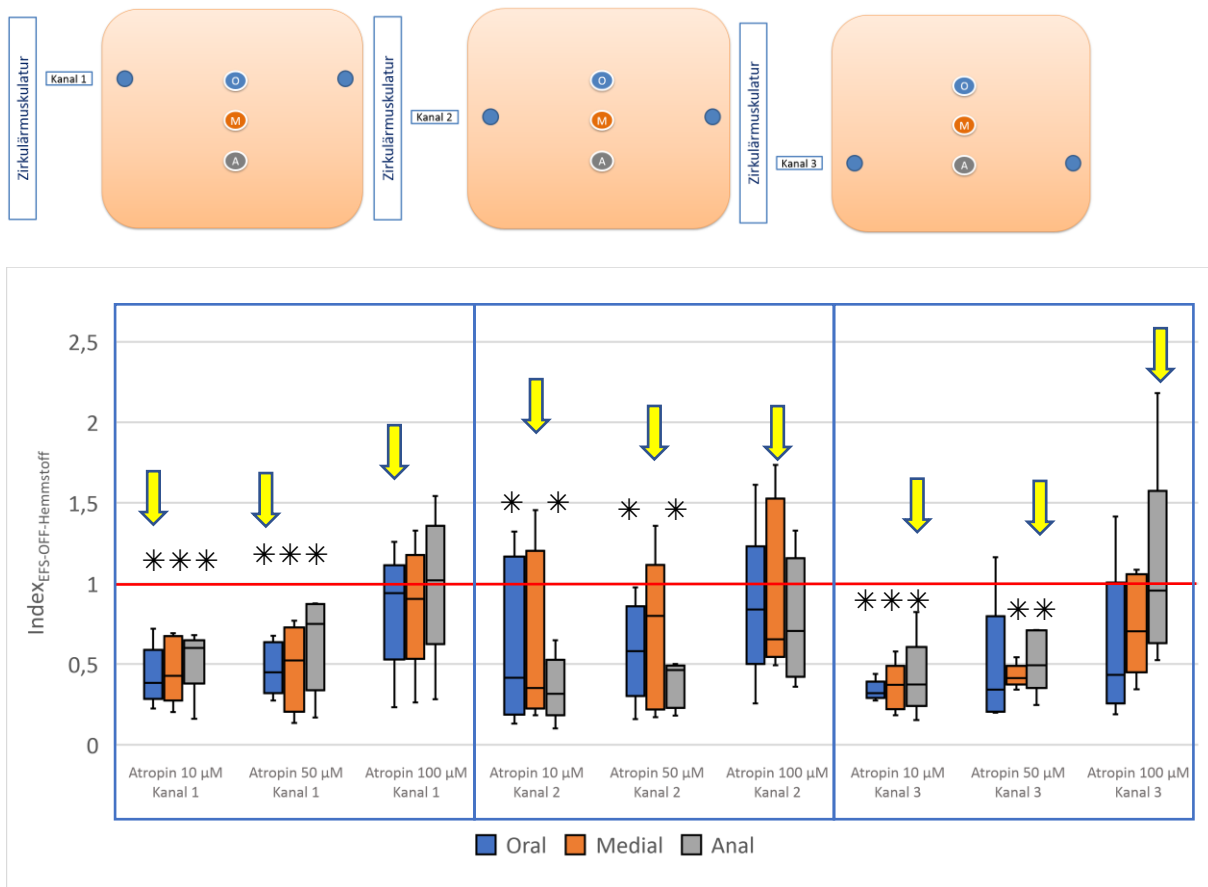


**Abb. 39: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 μM) auf die ON Antworten der Längsmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropinkonzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**

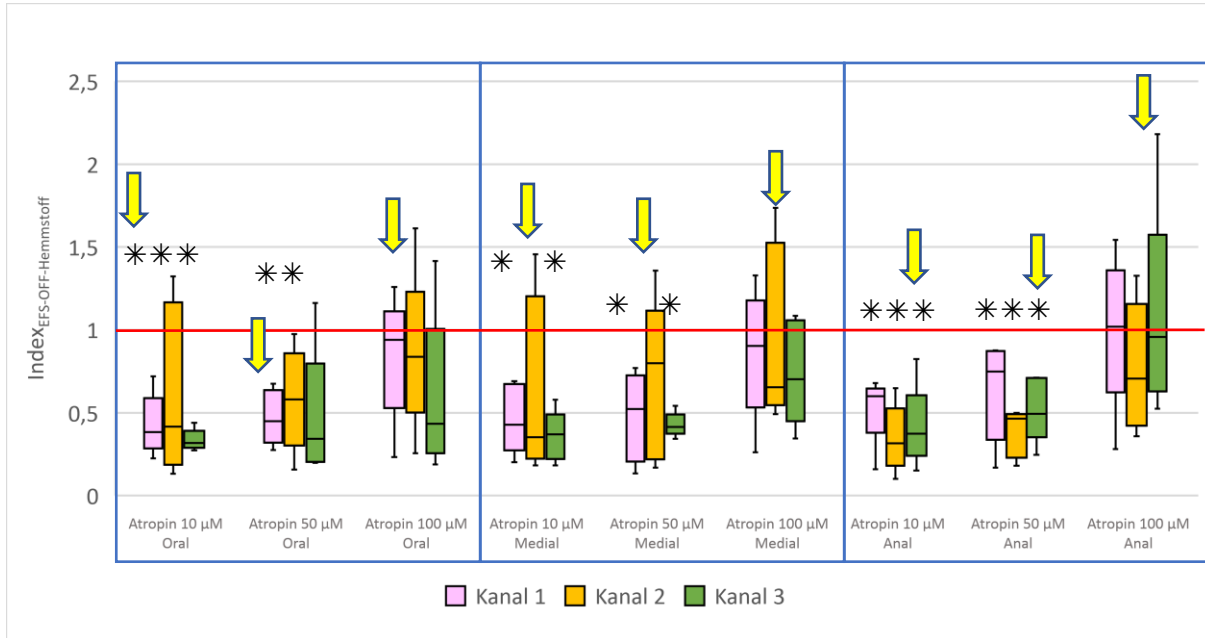
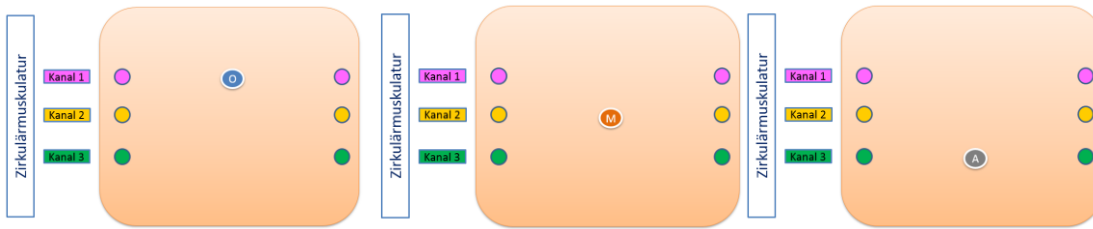


**Abb. 40: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  auf die ON Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropin-Konzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**

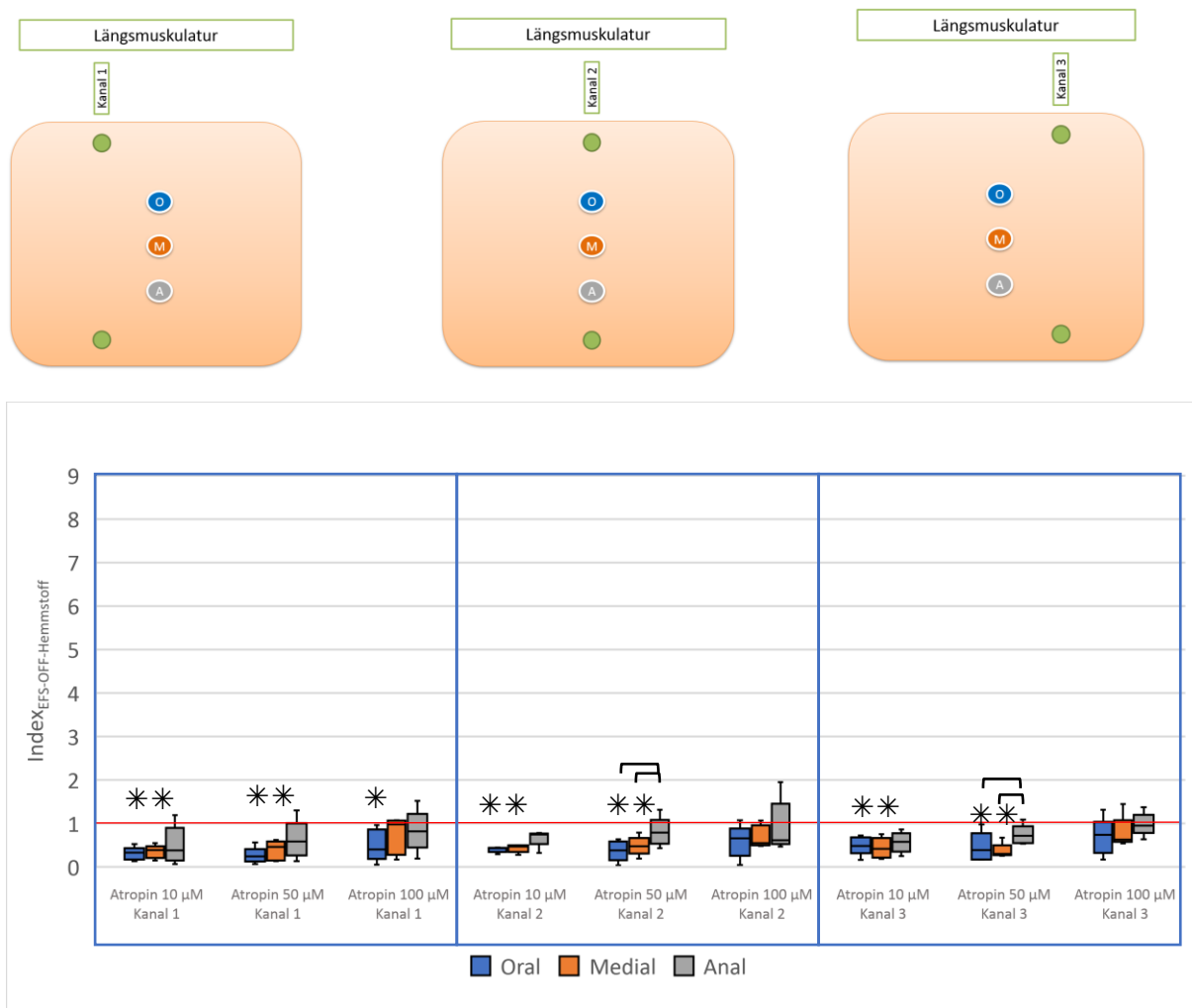




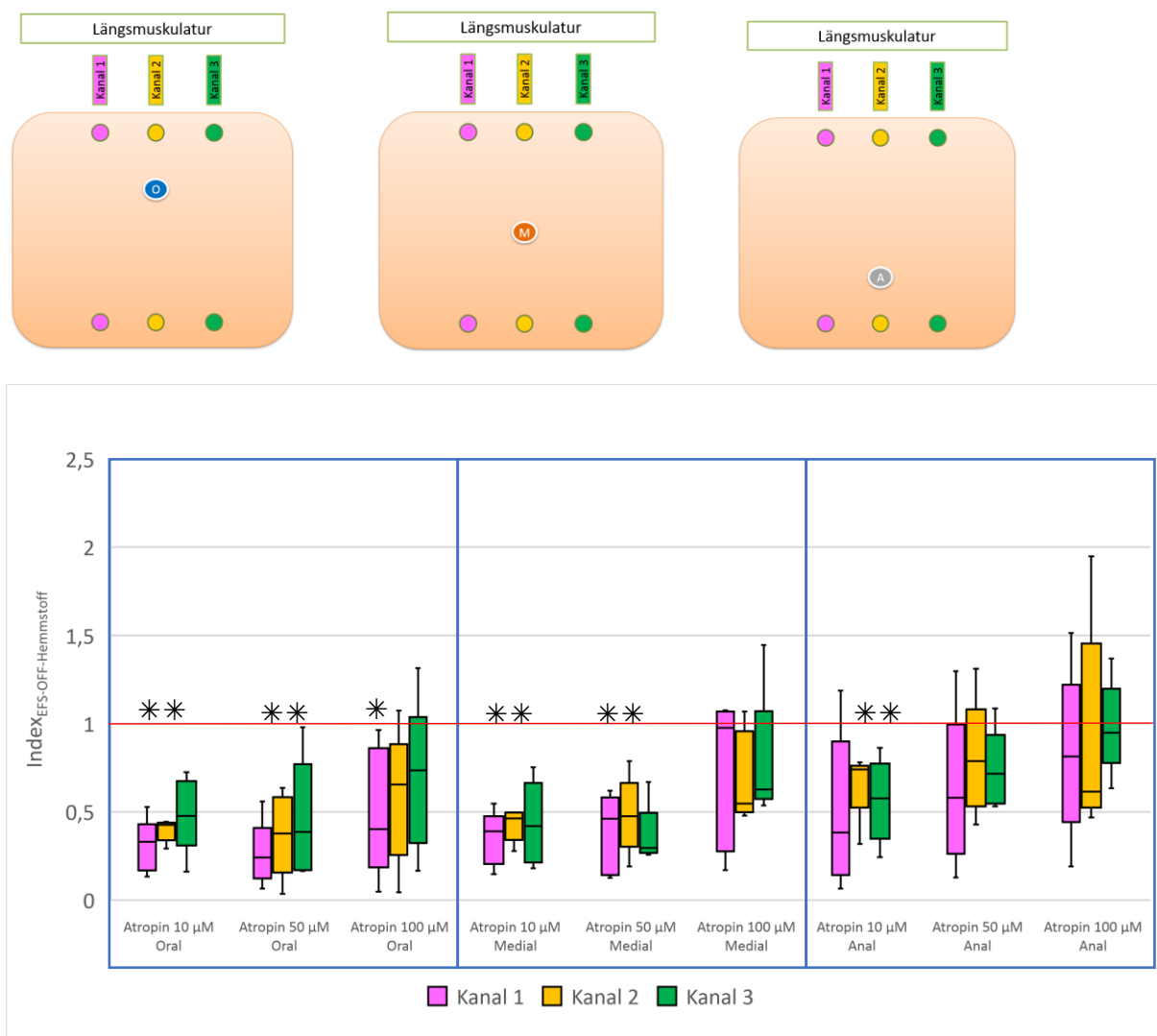
**Abb. 41: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-OFF-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropin-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



**Abb. 42: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-OFF-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropinkonzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**

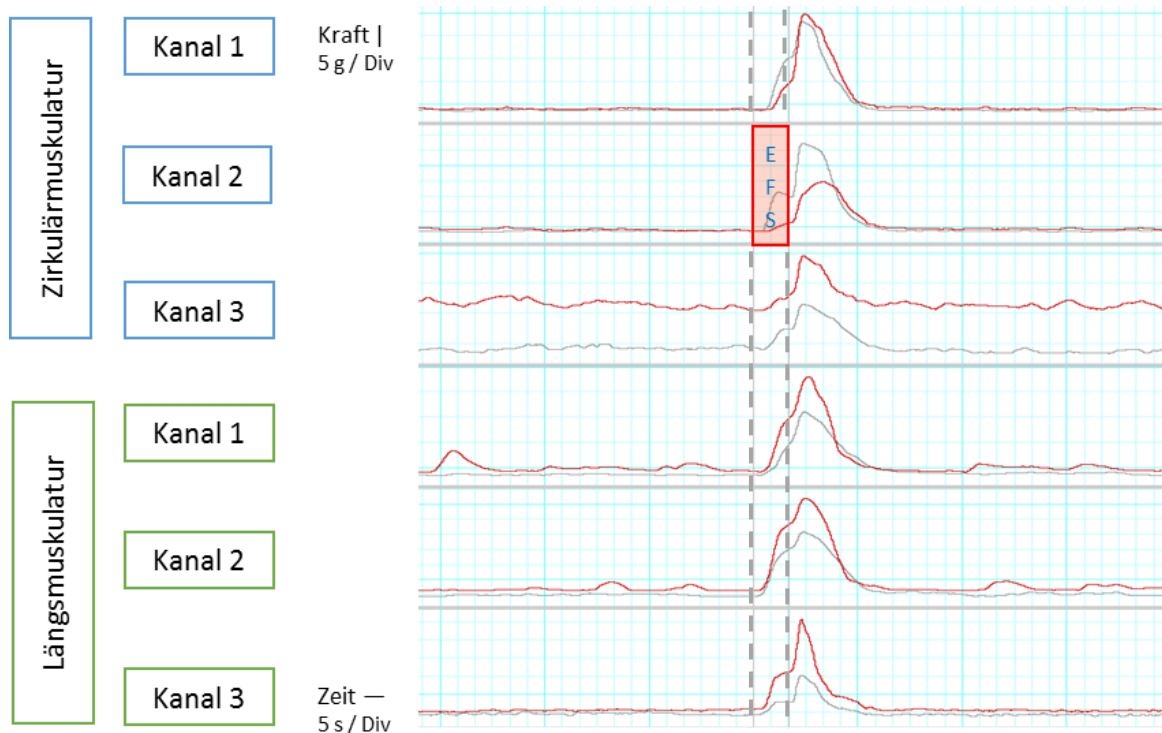


**Abb. 43: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM) auf die OFF Antworten der Längsmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-OFF-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropin-Konzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



**Abb. 44: Einfluss von Atropin (Endkonzentration in Lösung: 10, 50, 100 µM auf die OFF Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-OFF-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Atropin-Konzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**

#### 4.2.2.2.2 L-Name



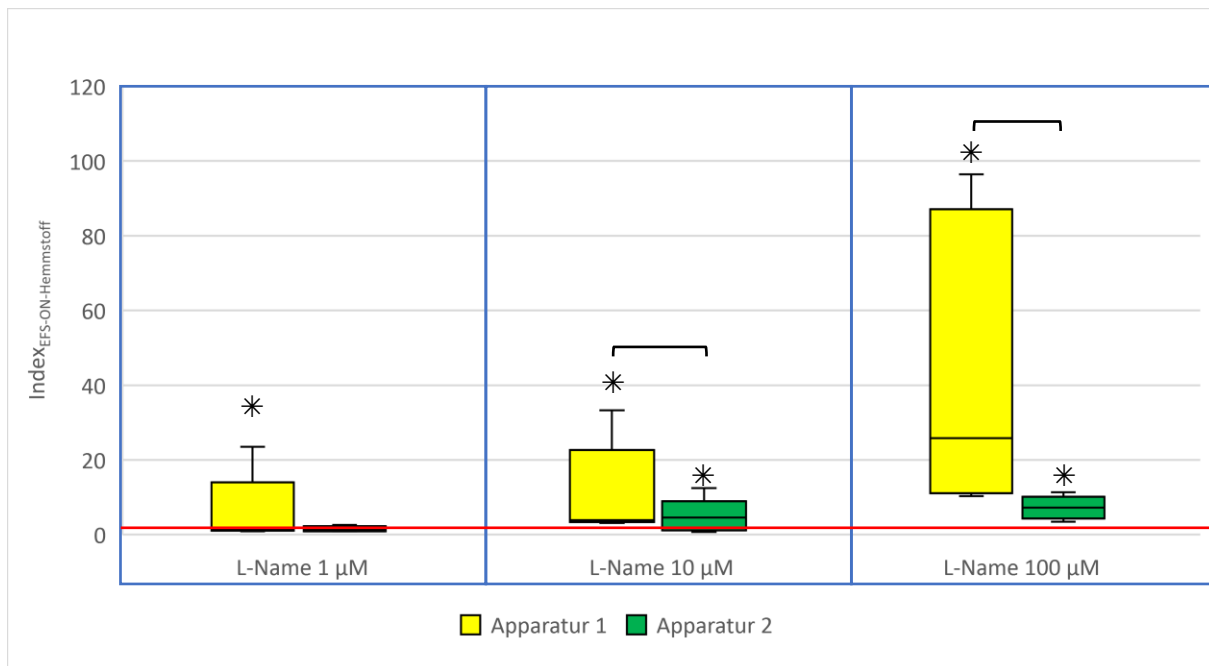
**Abb. 45: Original Messkurve an Apparatur 2 unter Kontrollbedingungen (rote Kurve) und L-Name-Einfluss, 10 µM (graue Kurve)**

Exemplarische Darstellung zweier Originalmesskurven, aufgenommen mit Apparatur 2. Rote Kurve = unter Kontrollbedingungen, graue Kurve = unter L-Name-Einfluss 10µM. EFS an Kanal 2, medial, Zirkulärmuskulatur

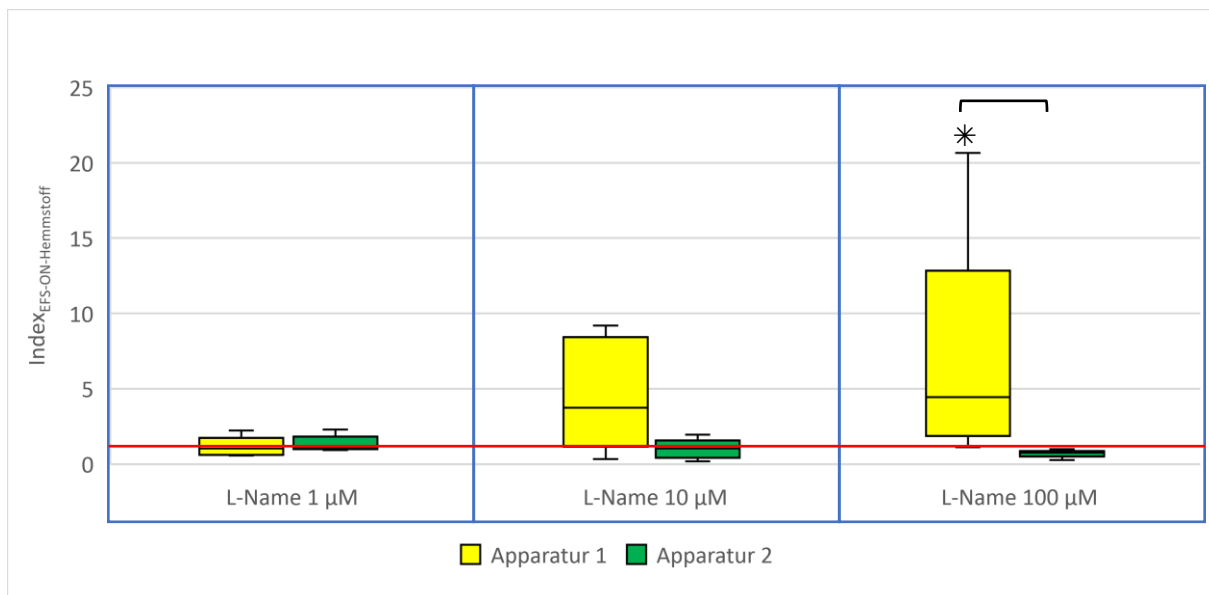
##### 4.2.2.2.2.1 Einfluss der Messmethode

ZM und LM zeigten unter L-Name-Einfluss unterschiedliche Reaktionen. Die Indizes sowohl der ON- als auch der OFF-Antworten erhöhten sich in beiden Messapparaturen nach L-Name-Applikation. Insbesondere in Apparatur 1 führte L-Name in allen drei Konzentrationsstufen (1, 10, 100 µM) zu einer signifikanten Erhöhung der Indices (Abb. 46-49). In Apparatur 2 konnten erst nach Applikation von L-Name Konzentrationen von 10 und 100 µM signifikante Effekte beobachtet werden.

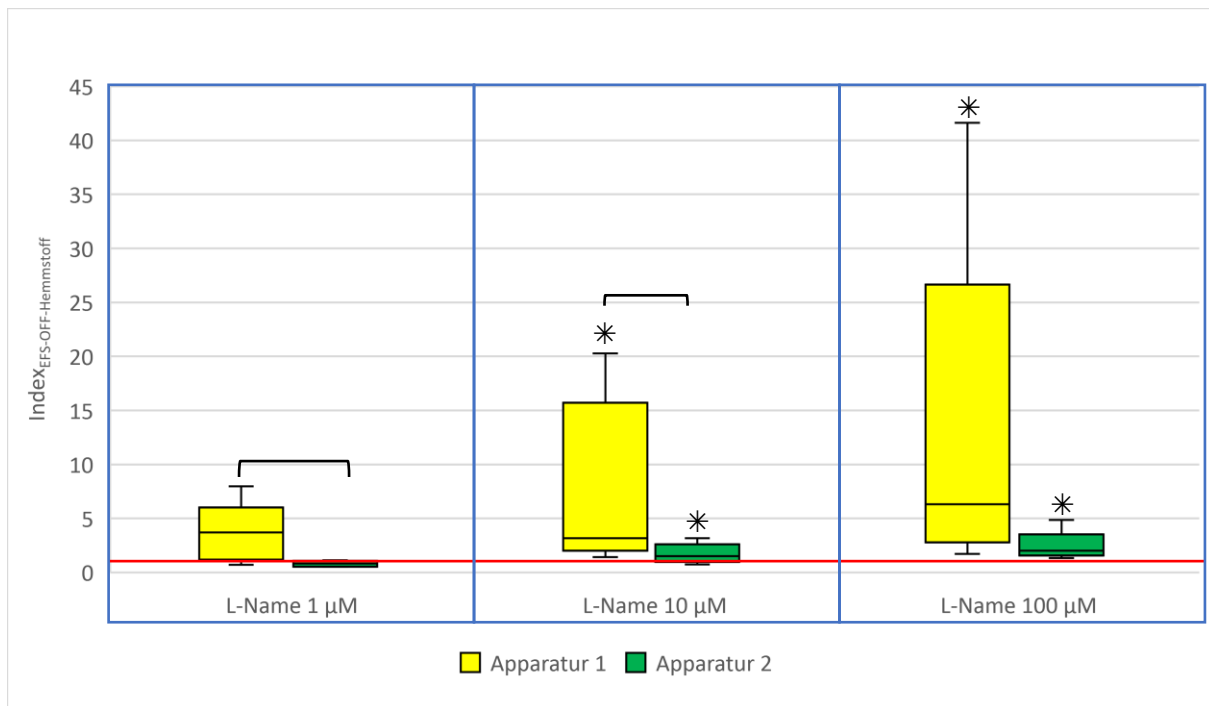
Auf die ON-Antworten der LM hatte L-Name kaum Wirkung, lediglich in Apparatur 1 führte eine L-Name Konzentration von 100µM zu einer signifikanten Erhöhung des Index (Abb. 47). Die Indices der OFF-Antworten der LM gemessen mit Apparatur 1 erhöhten sich unter L-Name. Dieser Effekt war unter L-Name 10 µM und 100 µM statistisch signifikant. Die Indices der OFF-Antworten der LM gemessen mit Apparatur 2 wurden hingegen durch L-Name verringert. Dieser Effekt war in der Konzentration 1 µM und 10 µM statistisch signifikant. L-Name modulierte also die OFF-Antworten in Abhängigkeit von der Messmethode gegensätzlich. Dieser Unterschied zwischen Apparatur 1 und 2 war in allen Konzentrationsstufen signifikant (Abb. 49).



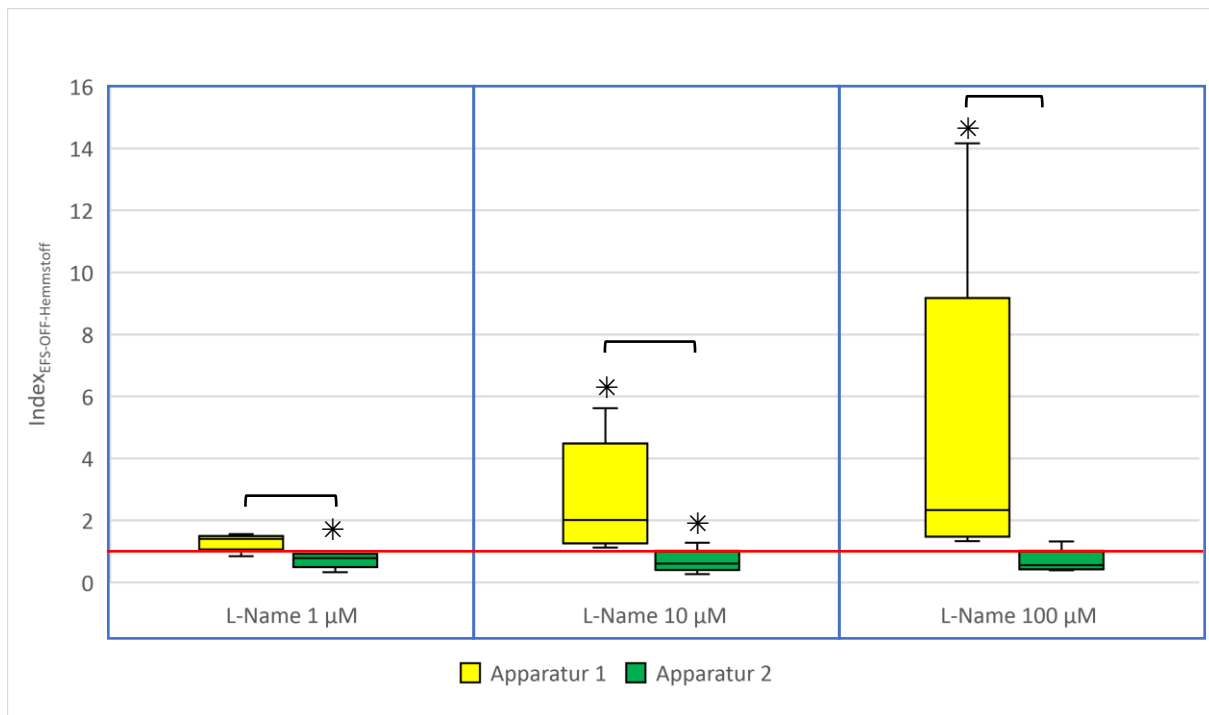
**Abb. 46:** Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM) auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2. Dargestellt sind die Indices der AUC der ON-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) unter L-Name Einfluss an der Zirkulärmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ , N=5.



**Abb. 47:** Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM) auf die ON Antworten der Längsmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2. Dargestellt sind die Indices der AUC der ON-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) unter L-Name Einfluss an der Längsmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ , N=5.



**Abb. 48: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2. Dargestellt sind die Indices der AUC der OFF-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) unter L-Name Einfluss an der Zirkulärmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ , N=5.**



**Abb. 49: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM) auf die OFF Antworten der Längsmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2. Dargestellt sind die Indices der AUC der OFF-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) unter L-Name Einfluss an der Längsmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .**

#### 4.2.2.2.2 Einfluss des Stimulationsortes

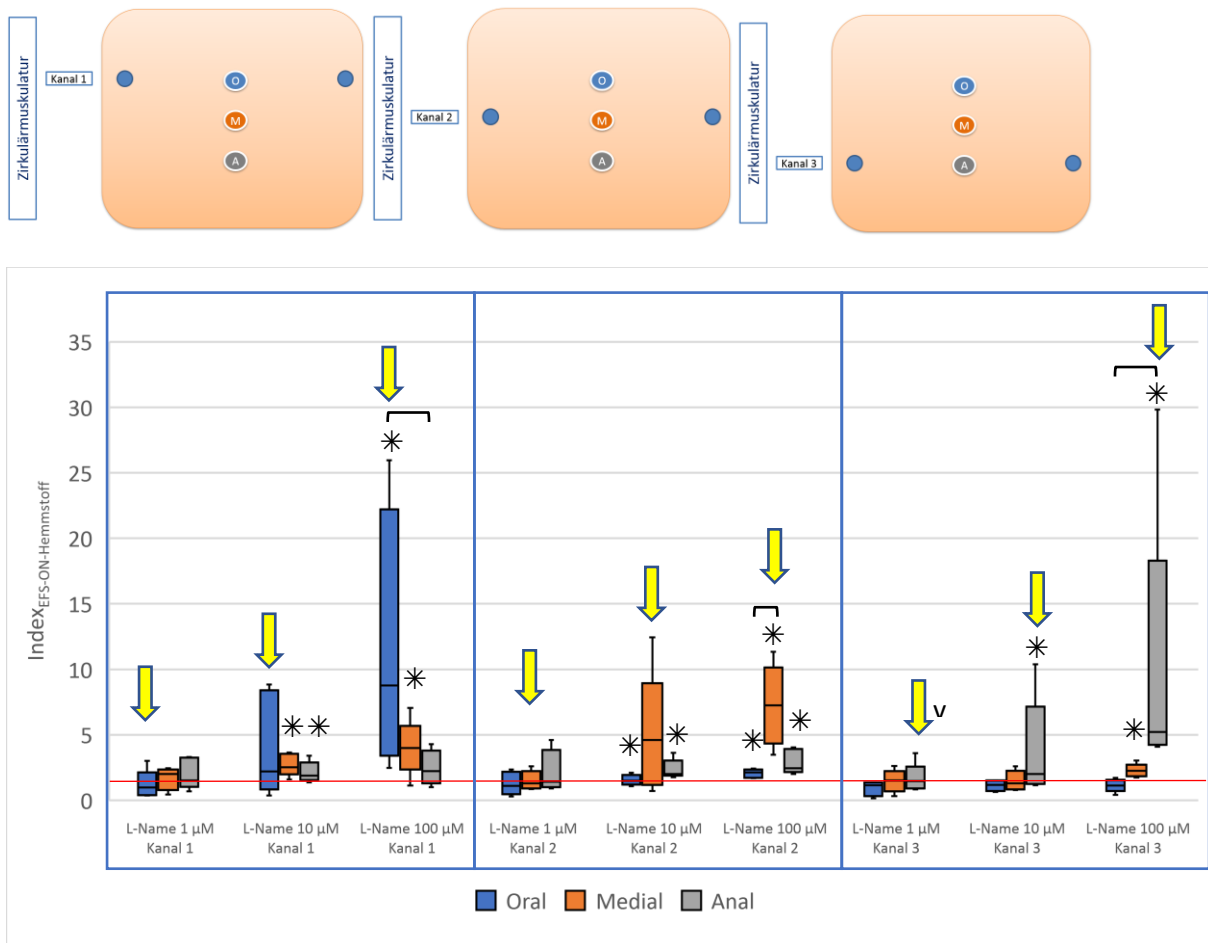
##### ON-Antwort

Die Mediane der Indices der ON-Antworten waren für jeden Kanal bei ableitungsnaher Stimulation numerisch am höchsten, also für Kanal 1 bei oraler Stimulation, für Kanal 2 bei medialer Stimulation und für Kanal 3 bei analer Stimulation (Abb. 50). In der Konzentrationsstufe 100 µM waren an jedem der drei Kanäle (1, 2 oder 3) signifikante Unterschiede zwischen den der Indices bei verschiedenen Stimulationsorten sichtbar: An Kanal 1 war der Index bei oraler Stimulation signifikant höher als bei analer Stimulation. An Kanal 2 war der Index bei medialem Stimulationsort signifikant höher als bei oraler Stimulation und an Kanal 3 führte die Stimulation an analer Position zu einem signifikant höheren Index als bei oralem Stimulationsort (Abb. 50).

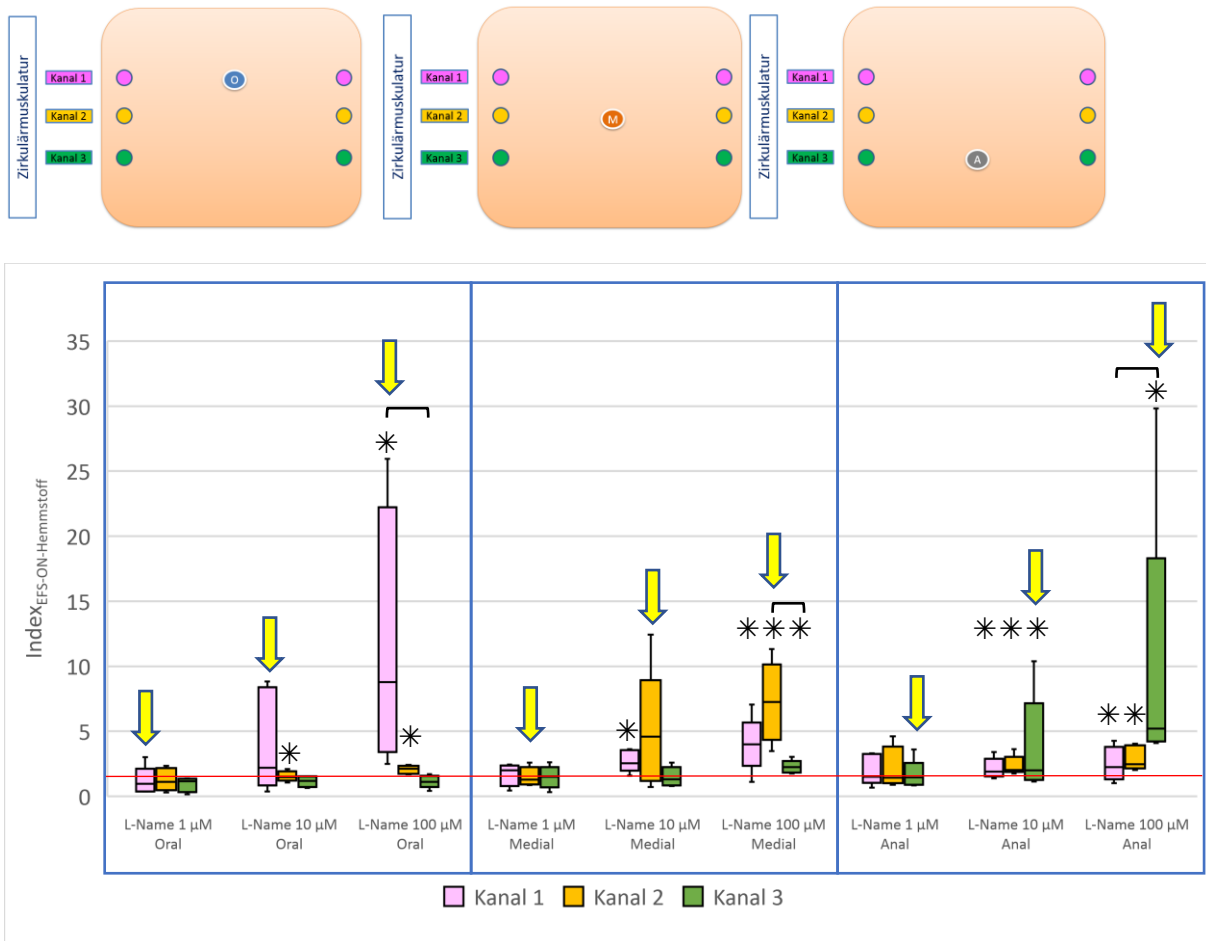
Weiterhin waren die Indices der ON-Antworten numerisch bei ableitungsnaher Stimulation an dem entsprechenden Messkanal höher als bei den beiden anderen Messkanälen (Abb. 51). Dieser Effekt war bei L-NAME Konzentrationen von 10 µM schon detektierbar ( $p=0,080$  bis  $0,138$ ) und wurde bei 100 µM als signifikant untersetzt. Mit L-Name in der Konzentration von 100 µM waren bei oraler Stimulation die Indices an Kanal 1 signifikant höher als an Kanal 3, bei medialer Stimulation an Kanal 2 signifikant höher als an Kanal 3 und bei analer Stimulation an Kanal 3 signifikant höher als an Kanal 1 (Abb. 51).

Hingegen zeigte sich für die Indices der ON-Antworten der LM unter L-Name eine eher geringe Abhängigkeit vom Stimulationsort. Bei oralem Stimulationsort wurden lediglich signifikante Unterschiede zwischen den Indices der an Kanal 1 und 3 unter 100µM L-Name ermittelten Werte nachgewiesen (Abb. 53).

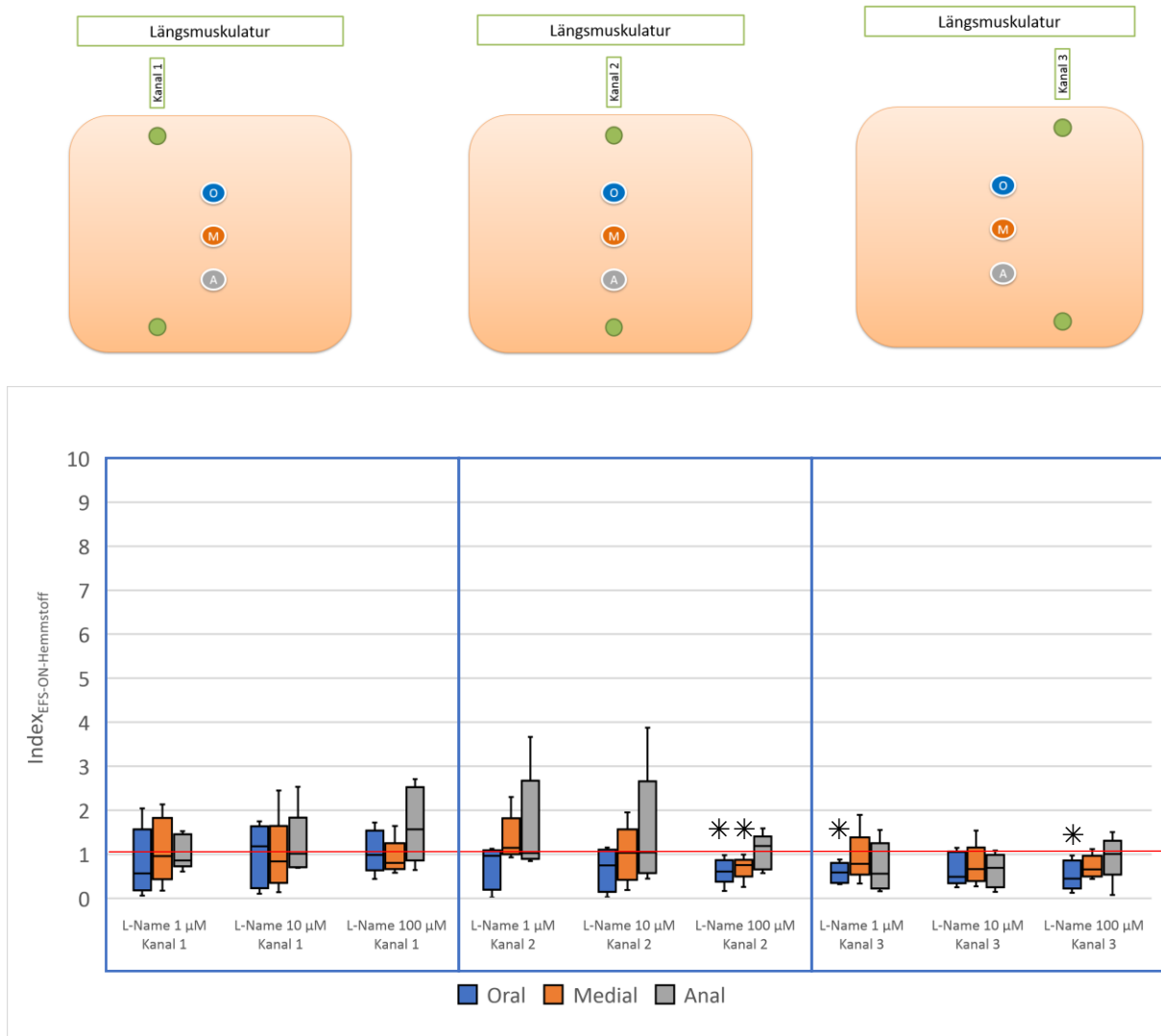




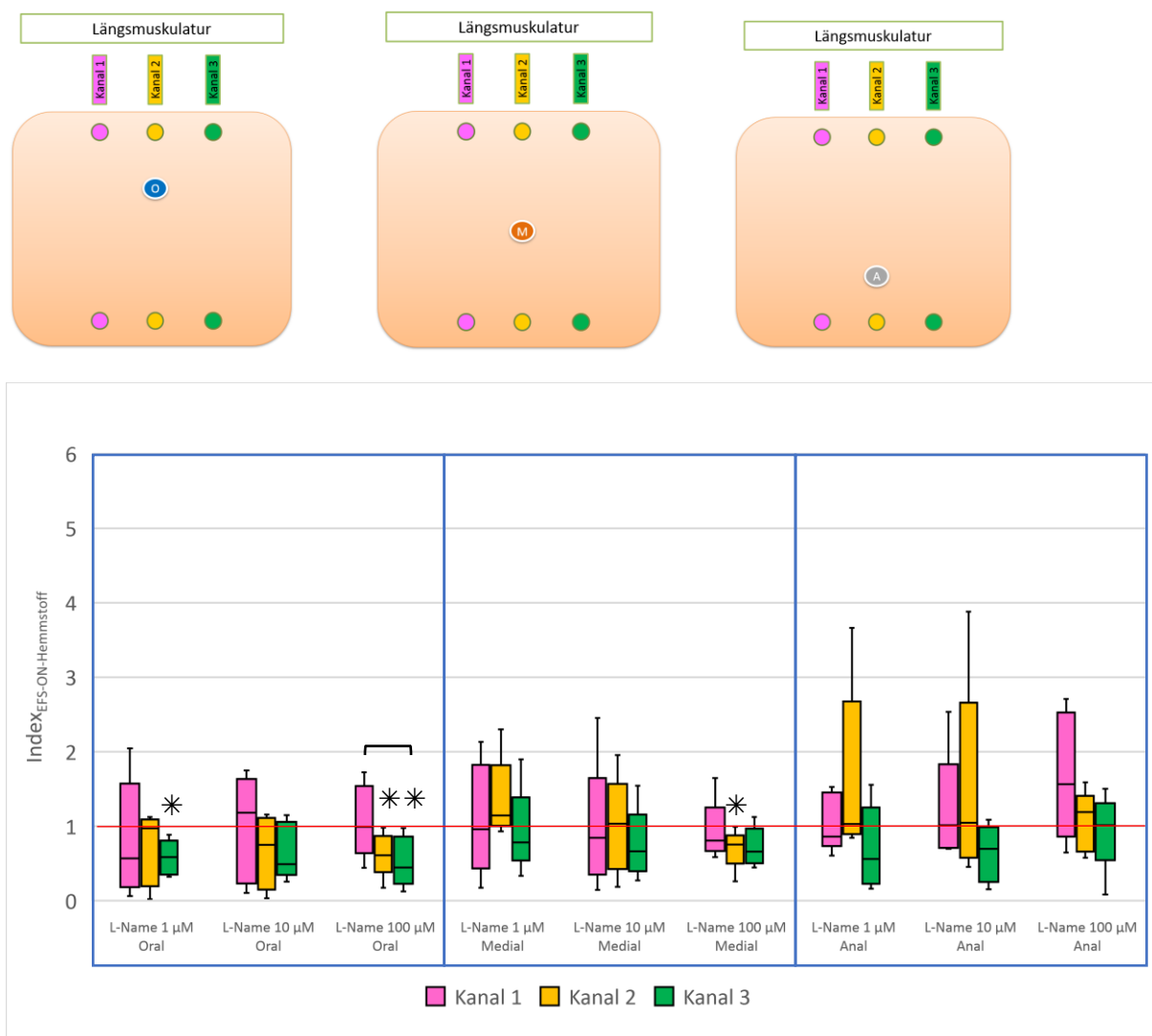
**Abb. 50: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 μM auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



**Abb. 51: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 μM) auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



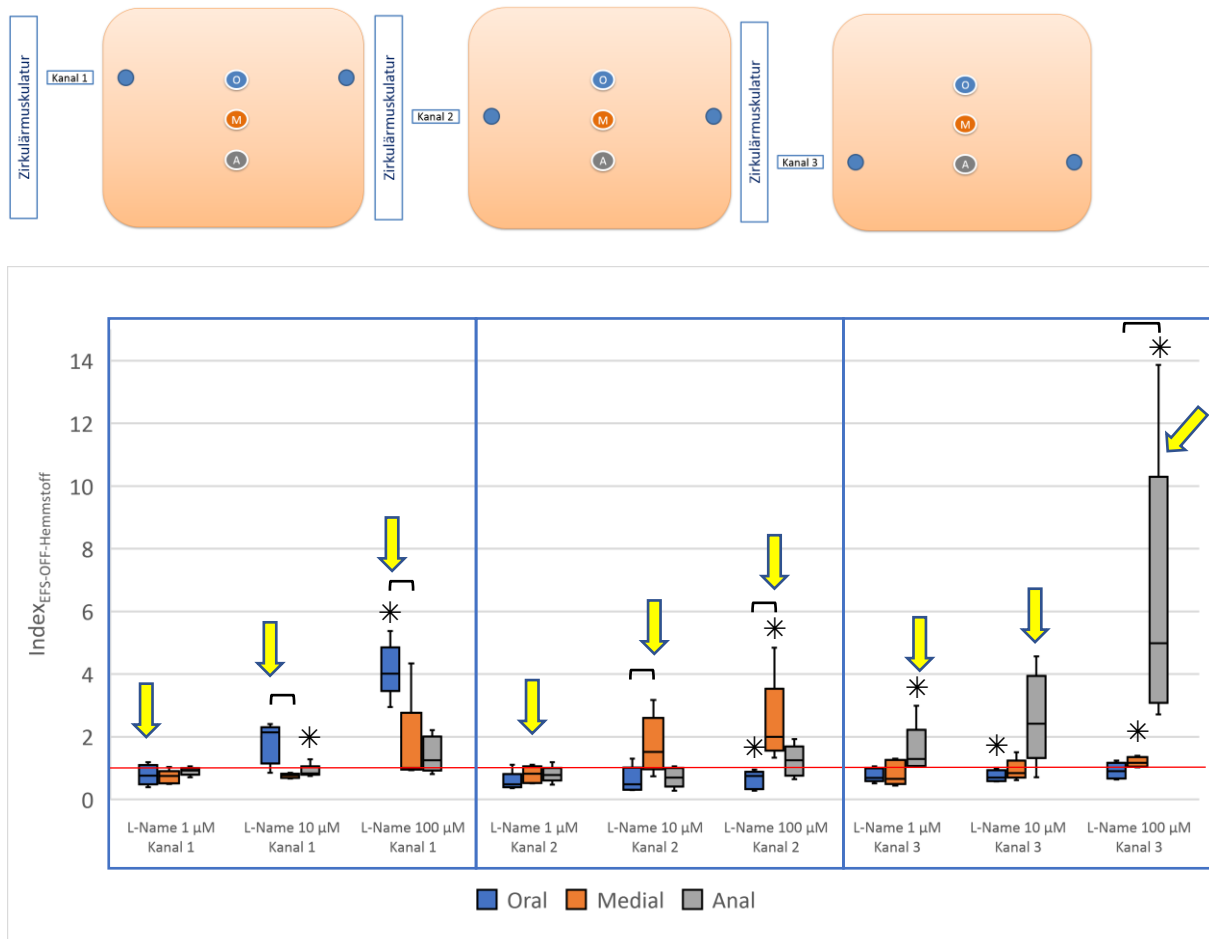
**Abb. 52: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 μM) auf die ON Antworten der Längsmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



**Abb. 53: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  auf die ON Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**

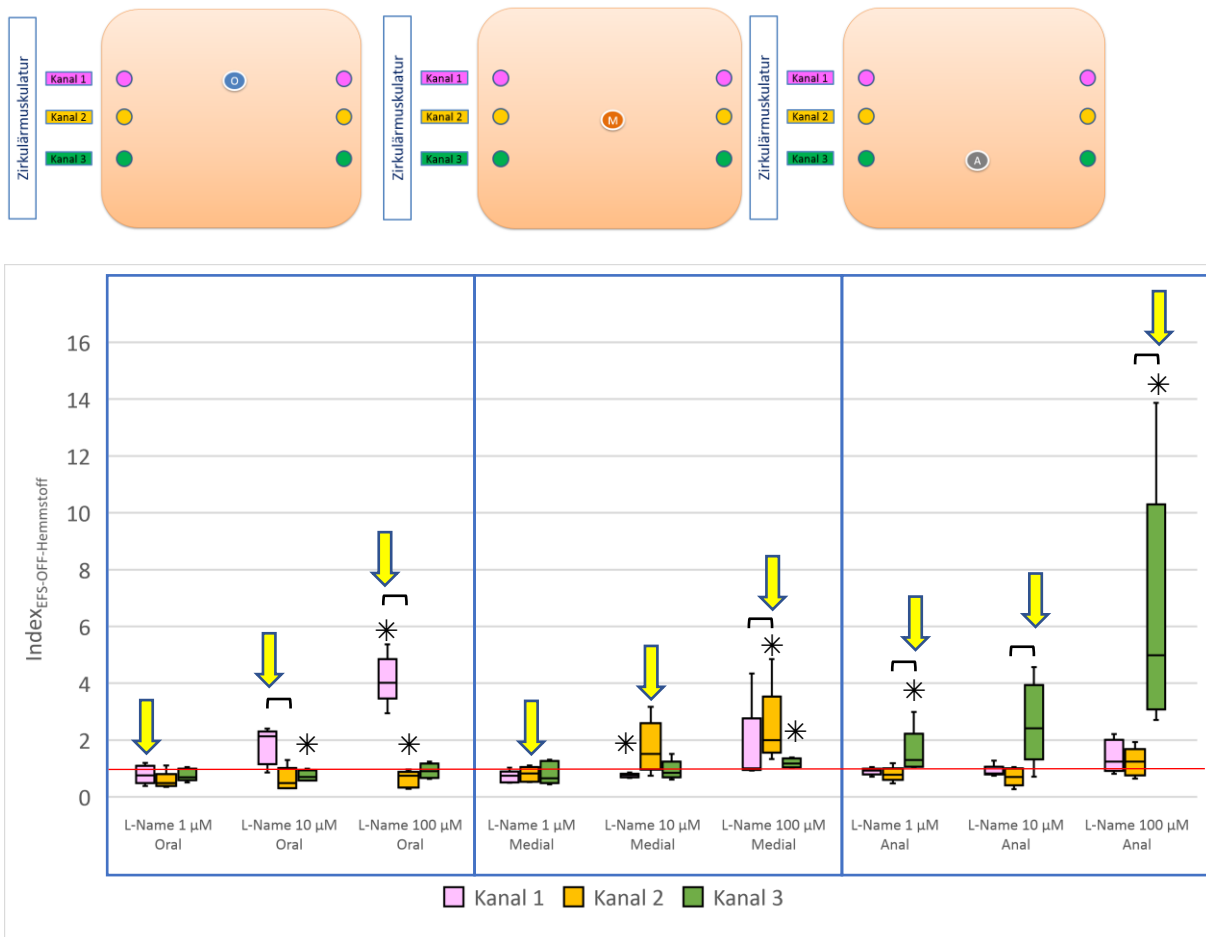
## OFF-Antwort

Auch bei der OFF-Antwort waren an der Zirkulärmuskulatur die Indices bei ableitungsnaher Stimulation am höchsten (Abb. 54 und 55). An Kanal 1 induzierten 10 und 100  $\mu\text{M}$  L-NAME einen signifikant höheren Index bei oraler Stimulation als bei medialem Stimulationsort. An Kanal 2 war der Index bei 10 und 100  $\mu\text{M}$  bei medialem Stimulationsort verglichen mit oraler Stimulation signifikant höher. Bei Kanal 3 war der Index bei 100  $\mu\text{M}$  bei analer Stimulation signifikant höher, als wenn oral stimuliert wurde (Abb. 54).



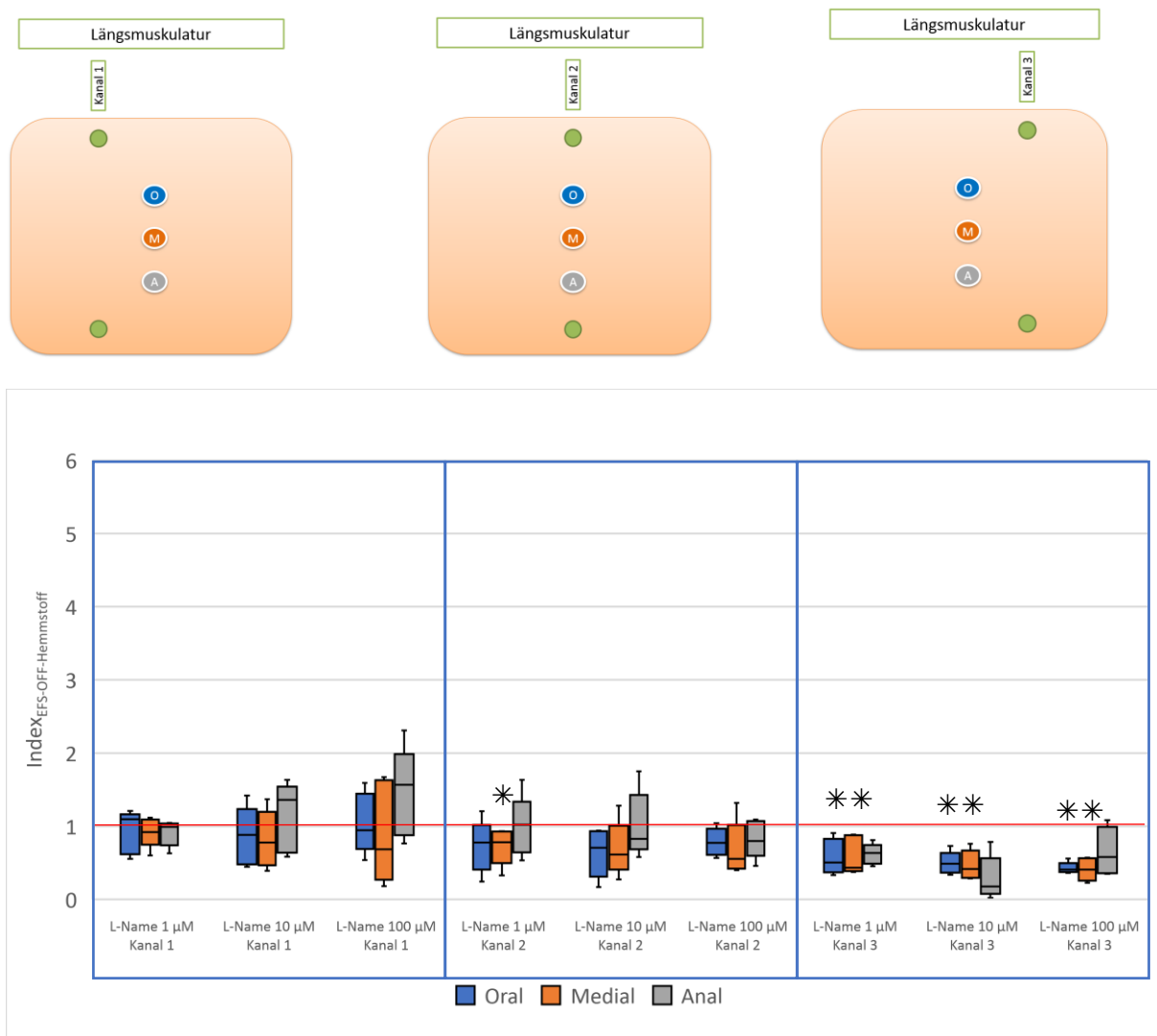
**Abb. 54: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur je Messkanal.** Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-OFF-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.

Ein Zusammenhang zwischen dem Stimulationsort und der L-NAME Wirkung war auch beim zeitgleichen Vergleich der drei Kanäle während der Stimulation sichtbar. So war bei oraler Stimulation unter L-NAME Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$  der Index an Kanal 1 signifikant höher als an Kanal 2. Ebenso waren bei medialem und analem Stimulationsort die Indices für Kanal 2 bzw. 3 meist höher als die der unmittelbar oral davon liegenden Kanäle 1 bzw. 2 (siehe Abb. 55).

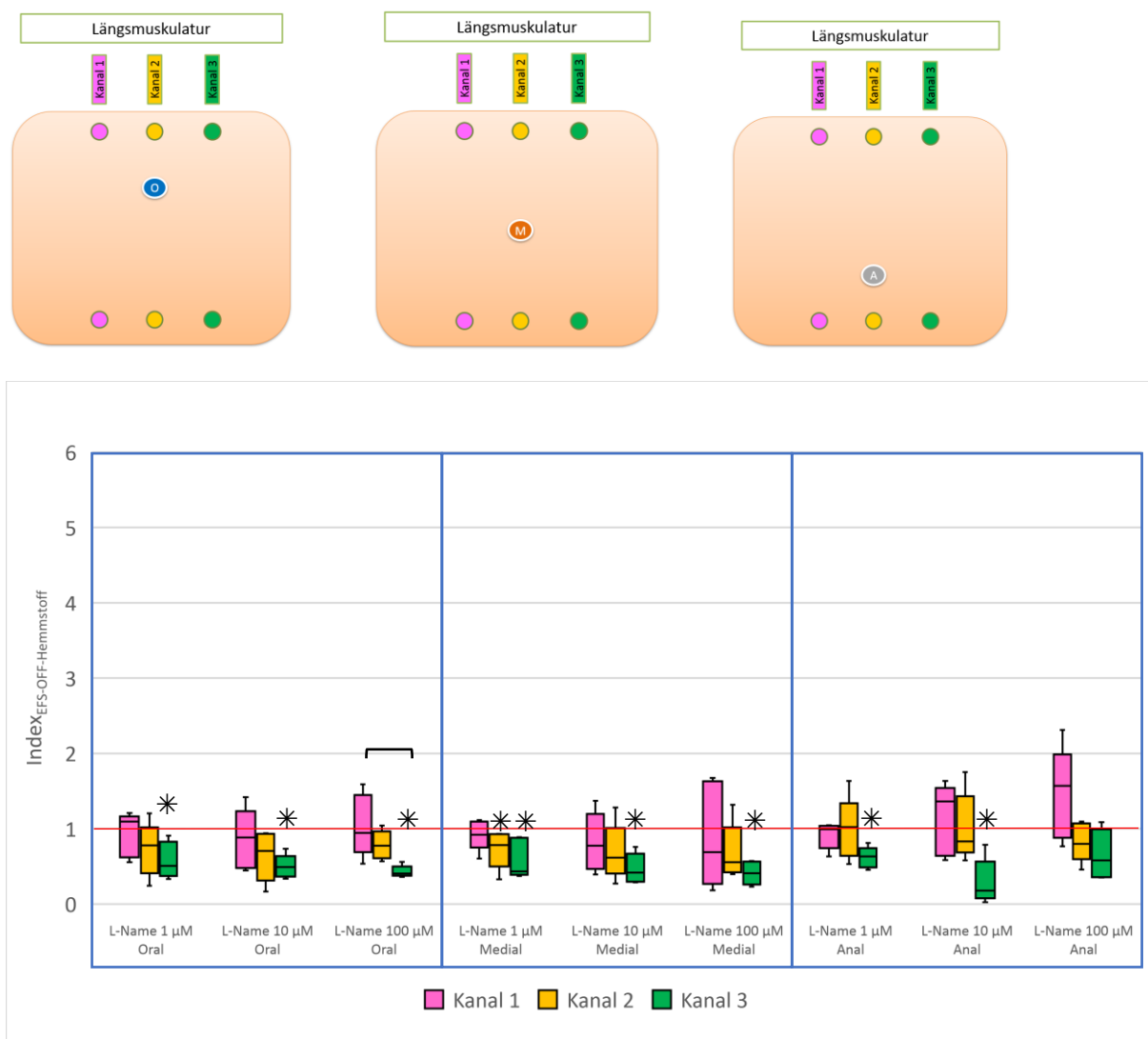


**Abb. 55: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index  $< 1$  = hemmend, Index  $> 1$  = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni,  $N=5$ .**

Für die OFF-Antworten der LM unter L-Name konnte beobachtet werden, dass Kanal 3 unabhängig vom Stimulationsort in nahezu allen drei Konzentrationsstufen signifikant niedrigere Indices im Vergleich zur Kontrolle (Index  $< 1$ ) aufwies (Abb. 56). Die an Kanal 1 und 2 ermittelten Werte zeigten bis auf eine Ausnahme (Kanal 2 unter 100 $\mu\text{M}$  L-Name) keine Unterschiede zur Kontrolle (Index nicht unterschiedlich zu 1, Abb. 56). Unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{M}$  L-Name konnte ein signifikanter Unterschied nach oraler Stimulation in den Indices der OFF-Antworten zwischen den drei Messkanälen der LM festgestellt werden, hierbei war der für Kanal 1 ermittelte Index signifikant höher als der von Kanal 3 (Abb. 57). Eine generelle Abhängigkeit der EFS-Antworten vom Stimulationsort wie für die OFF-Antworten der ZM konnte an der LM unter L-Name nicht beobachtet werden.



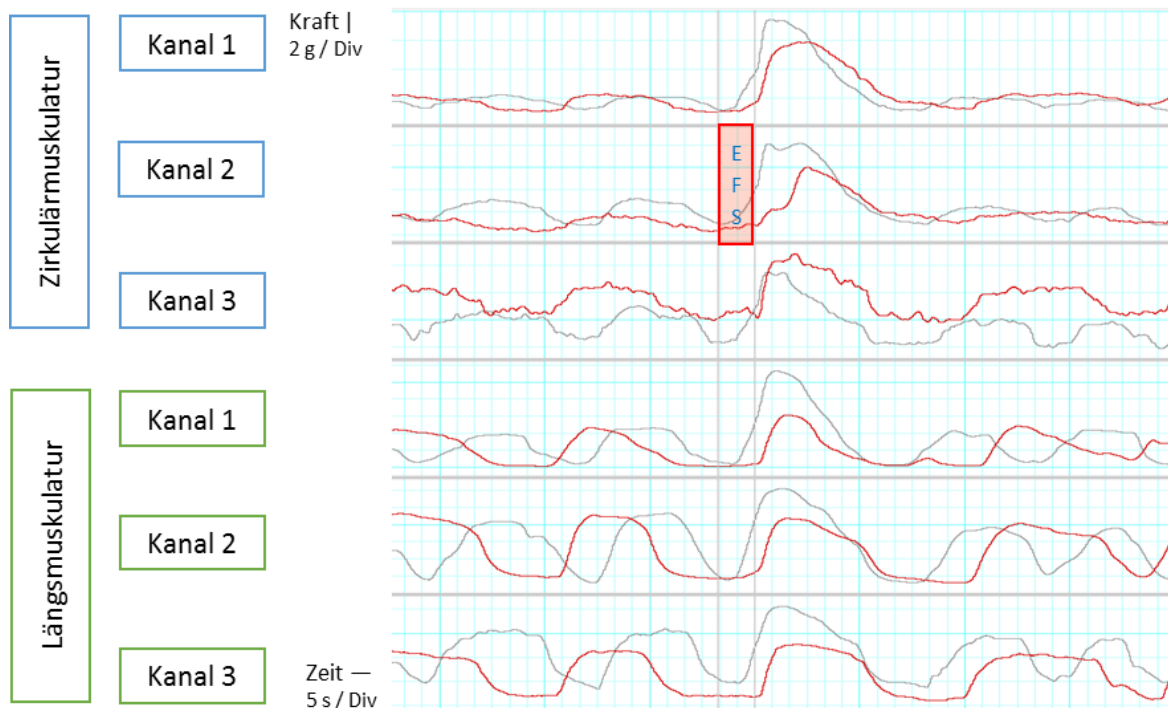
**Abb. 56: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 μM) auf die OFF Antworten der Längsmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-OFF-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



**Abb. 57: Einfluss von L-Name (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM auf die OFF Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-OFF-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und L-Name-Konzentration.** Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.



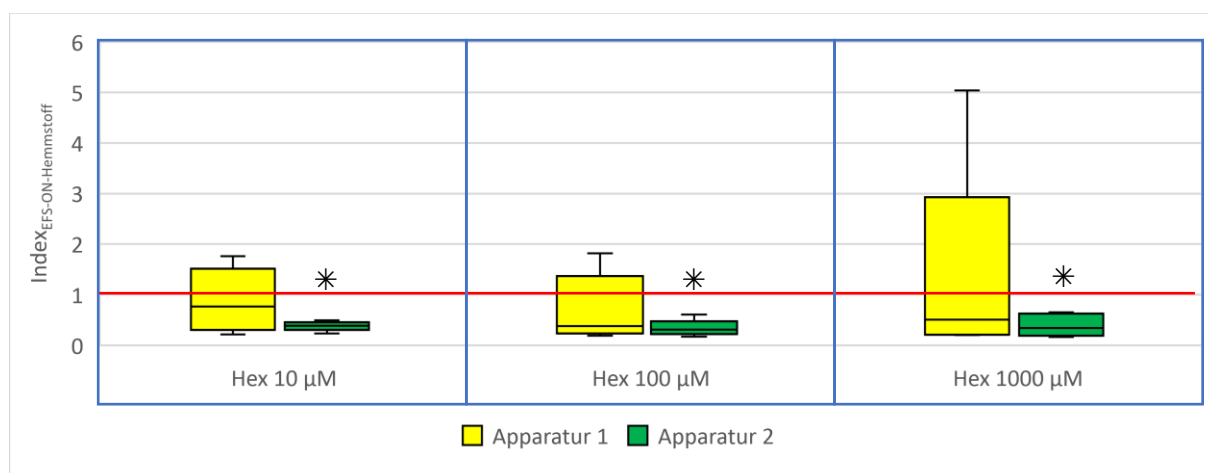
#### 4.2.2.2.3 Hexamethonium



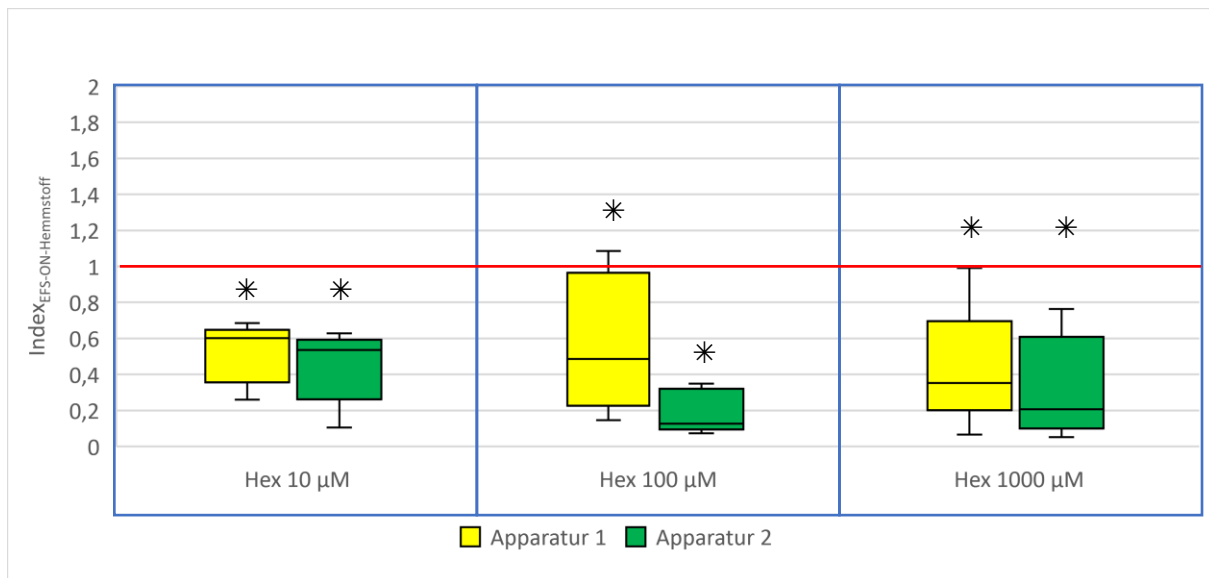
**Abb. 58: Original Messkurve an Apparatur 2 unter Kontrollbedingungen (rote Kurve) und Hexamethonium-Einfluss, 100 µM (graue Kurve)** Exemplarische Darstellung zweier Originalmesskurven, aufgenommen mit Apparatur 2. Rote Kurve = unter Kontrollbedingungen, graue Kurve = unter Hexamethonium-Einfluss 10µM. EFS an Kanal 2, medial, Zirkulärmuskulatur

##### 4.2.2.2.3.1 Einfluss der Messmethode

ZM und LM zeigten unter Hexamethonium-Einfluss unterschiedliche Reaktionen. Hexamethonium hemmte die ON-Antworten der ZM an Apparatur 2 in allen drei Konzentrationen signifikant (Indices <1, Abb. 59). Hingegen war an Apparatur 1 auf die ON-Antworten der ZM kaum eine Wirkung feststellbar (Index nicht unterschiedlich zu 1, Abb. 59). Die ON-Antworten der LM wurden durch Hex an Apparatur 1 und 2 stets statistisch signifikant vermindert (Indices <1, Abb. 60).

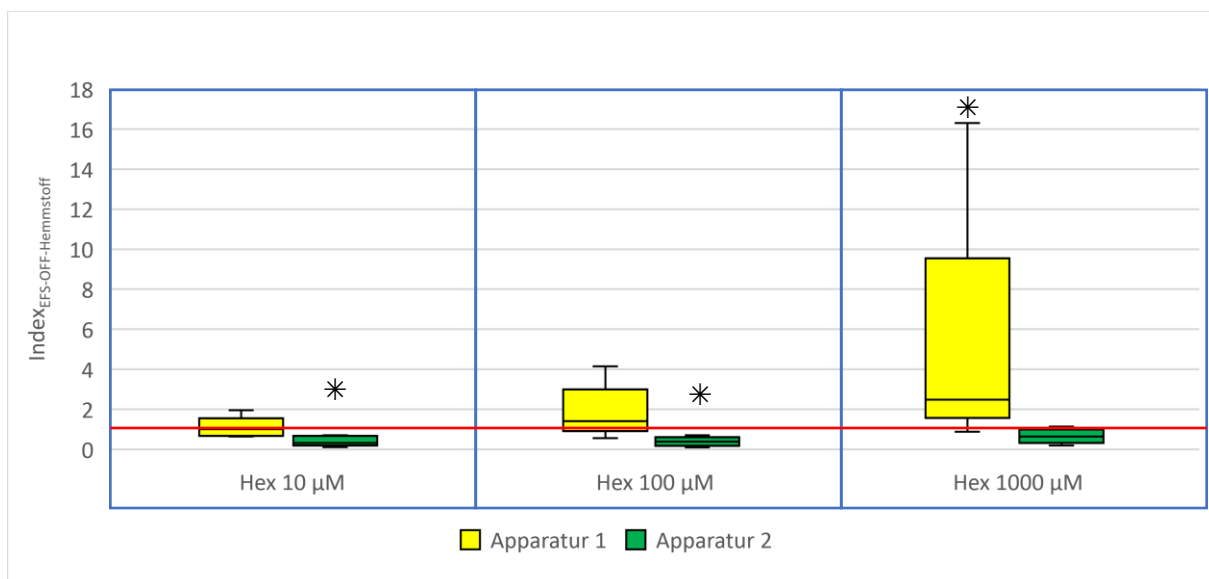


**Abb. 59: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 1, 10, 100 µM) auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2.** Dargestellt sind die Indices der AUC der ON-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) unter Hex Einfluss an der Zirkulärmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .



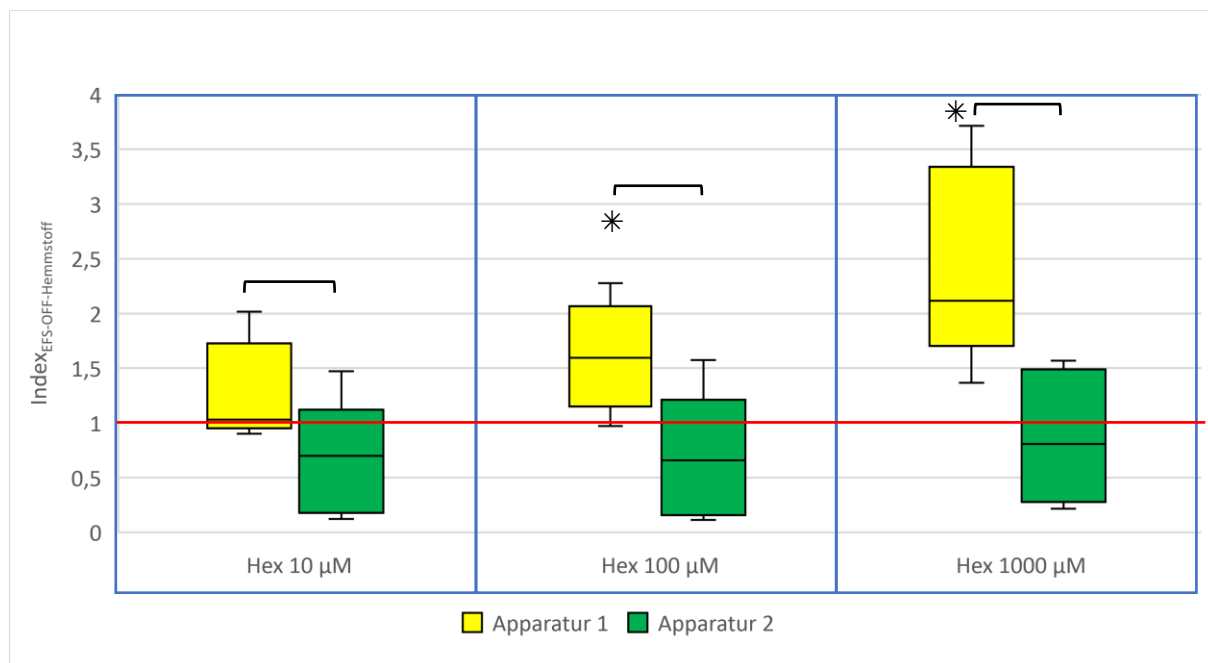
**Abb. 60: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM) auf die ON Antworten der Längsmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2. Dargestellt sind die Indices der AUC der ON-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) unter Hex Einfluss an der Längsmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .**

Hex-Konzentrationen von 10 und 100µM führten an der ZM in Apparatur 2 zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Indices der OFF-Antworten auf Werte <1. Hex in einer Konzentration von 1000µM verminderte die Indices der OFF-Antworten in App. 2 numerisch auf Werte <1. Die Indices der OFF-Antworten in Apparatur 1 wurden durch Hexamethonium bei 100µM leicht (Index numerisch >1) und bei 1000µM signifikant erhöht (Index >1, Abb. 61).



**Abb. 61: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2. Dargestellt sind die Indices der AUC der OFF-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) unter Hex Einfluss an der Zirkulärmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rangtest, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .**

Hexamethonium erhöhte die Indices der OFF-Antworten der LM, in Apparatur 1 auf Werte >1. Diese Erhöhung war für Hex-Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant. Hingegen schien Hexamethonium auf die OFF-Antworten der LM, gemessen mit Apparatur 2, zu vermindern, da numerisch die Indices der OFF-Antworten von Apparatur 2 stets <1 waren. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Messmethoden waren in allen Konzentrationsstufen feststellbar (Abb. 62).

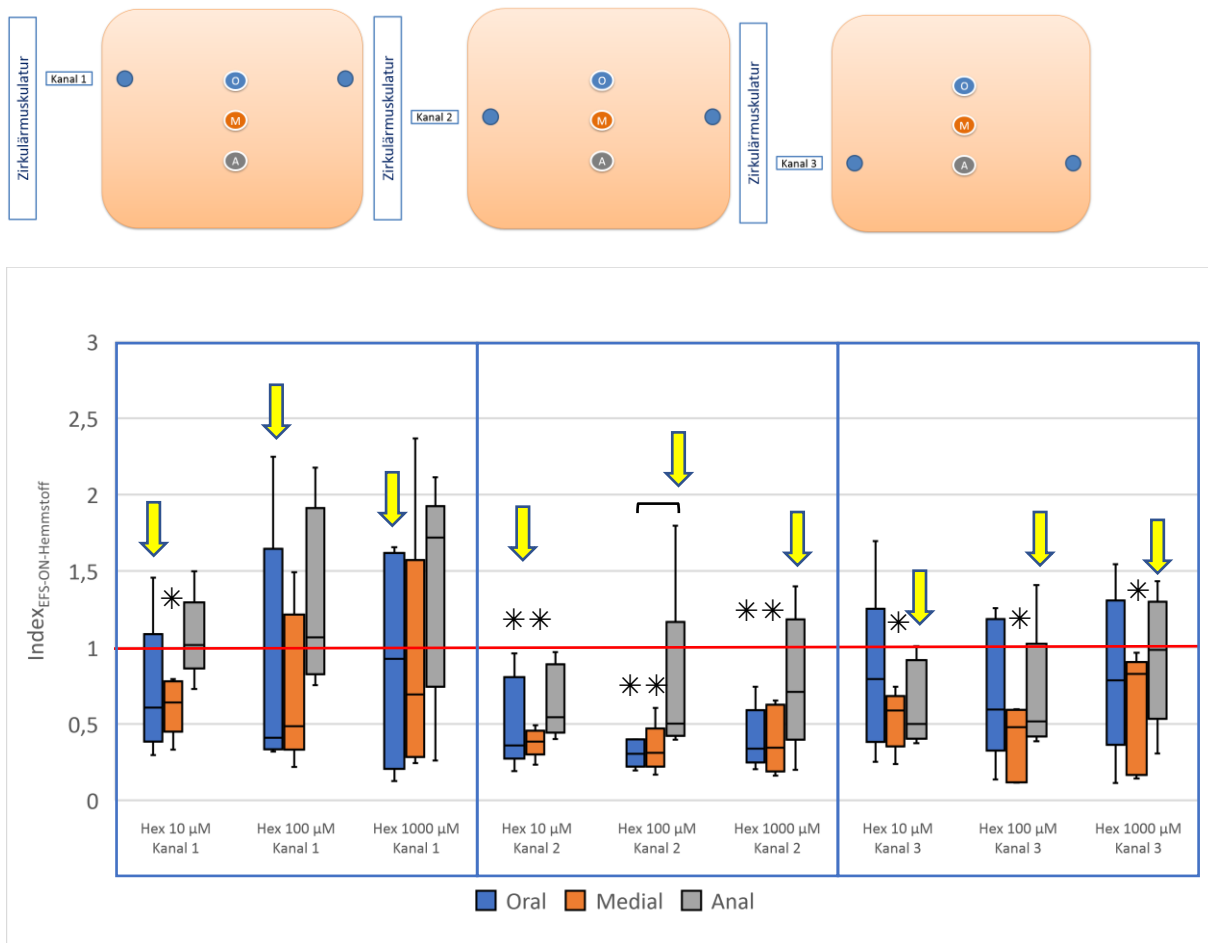


**Abb. 62: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) auf die OFF Antworten der Längsmuskulatur Vergleichend zwischen Apparatur 1 und 2. Dargestellt sind die Indices der AUC der OFF-Antworten ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) unter Hex Einfluss an der Längsmuskulatur jeweils für Apparatur 1 und 2.**

Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1 = markiert mit \*. \*. Klammer = signifikanter Unterschied der Indices zwischen Apparatur 1 und 2. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Paarweise Vergleiche: Wilcoxon-Test. Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ,  $N=5$ .

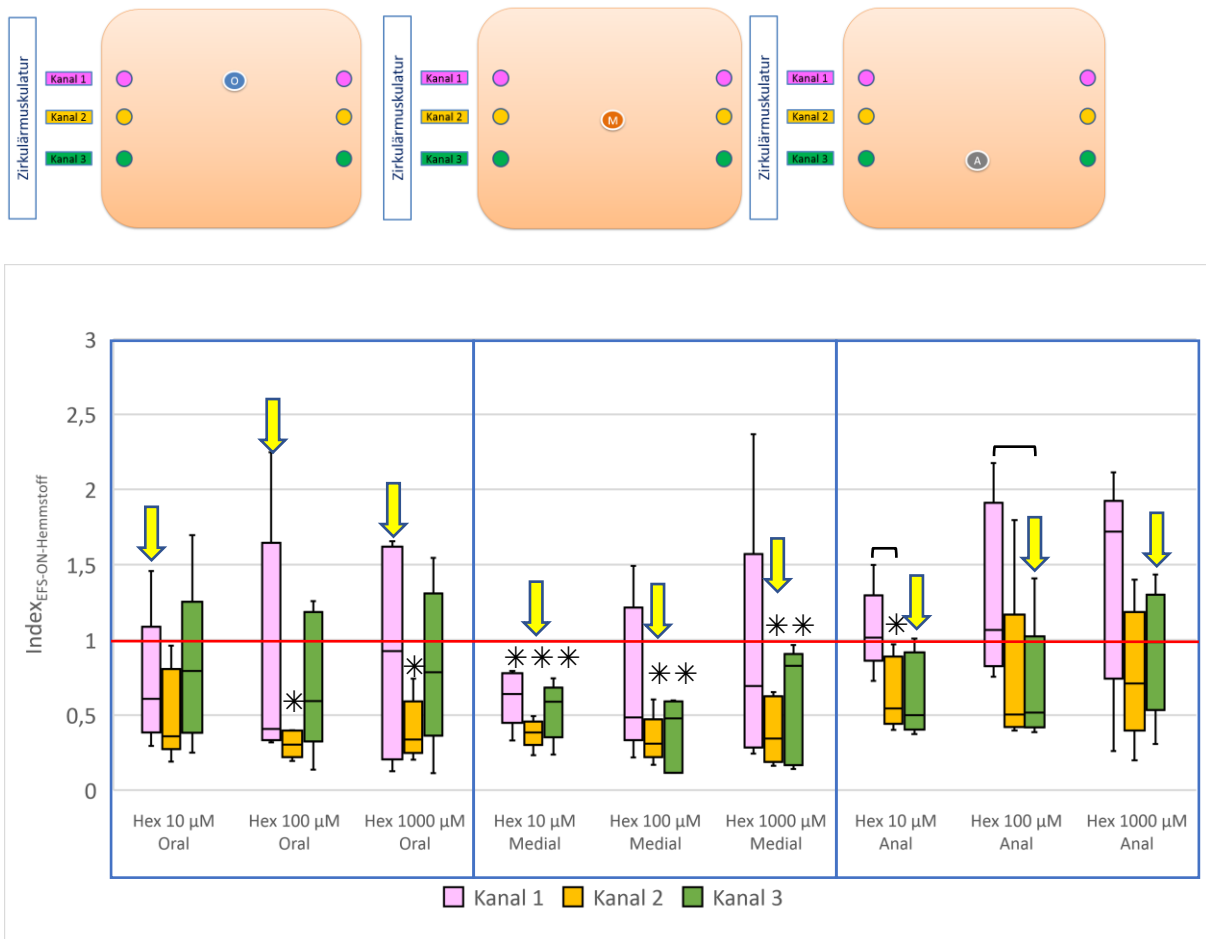
#### 4.2.2.2.3.2 Einfluss des Stimulationsortes

In der separaten Betrachtung der einzelnen Messkanäle für die ON-Antworten der ZM an Apparatur 2 bewirkte Hex in allen Konzentrationen (außer bei analer Stimulation an Kanal 1) im Median Indices <1. Vereinzelt waren diese nach oraler Stimulation an Kanal 1, sowie nach oraler und analer Stimulation an Kanal 2 und 3 unter 10 und 100  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant unterschiedlich zu 1 (Kontrolle) (Abb. 63). Die Indices der ON-Antworten der einzelnen Messkanäle an der ZM waren unter Hexamethonium-Einfluss nur vereinzelt vom Stimulationsort abhängig (Abb. 63). Lediglich unter Hexamethonium 100  $\mu\text{M}$  konnte eine signifikante Abhängigkeit vom Ort der EFS für Kanal 2 festgestellt werden. Der Index der ON-Antwort an Kanal 2 war nach oraler Stimulation signifikant niedriger, als nach analer Stimulation (Abb. 63).



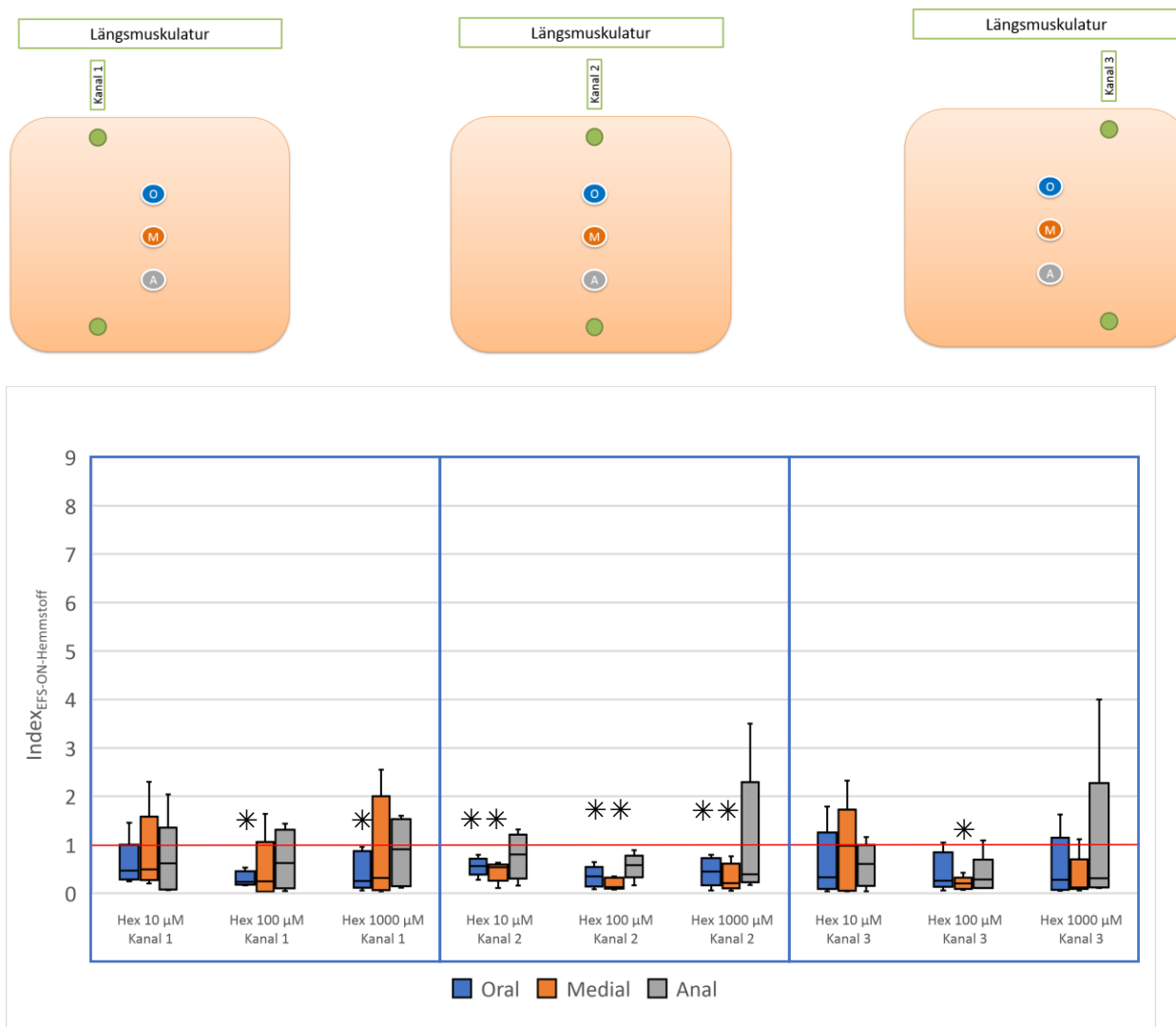
**Abb. 63: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**

In der Darstellung von Abb. 64 war eine Abhängigkeit der Indices der ON-Antworten vom Stimulationsort auf die benachbarten Messkanäle der ZM bei analer Stimulation statistisch bei Hex-Konzentrationen von 10 und 100µM nachweisbar. Nach analer Stimulation war hier in der Konzentrationsstufe 10 µM der Index an Kanal 1 signifikant höher als an Kanal 2 und bei 100 µM L-Name war der Index an Kanal 1 signifikant höher als an Kanal 3 (Abb. 64).

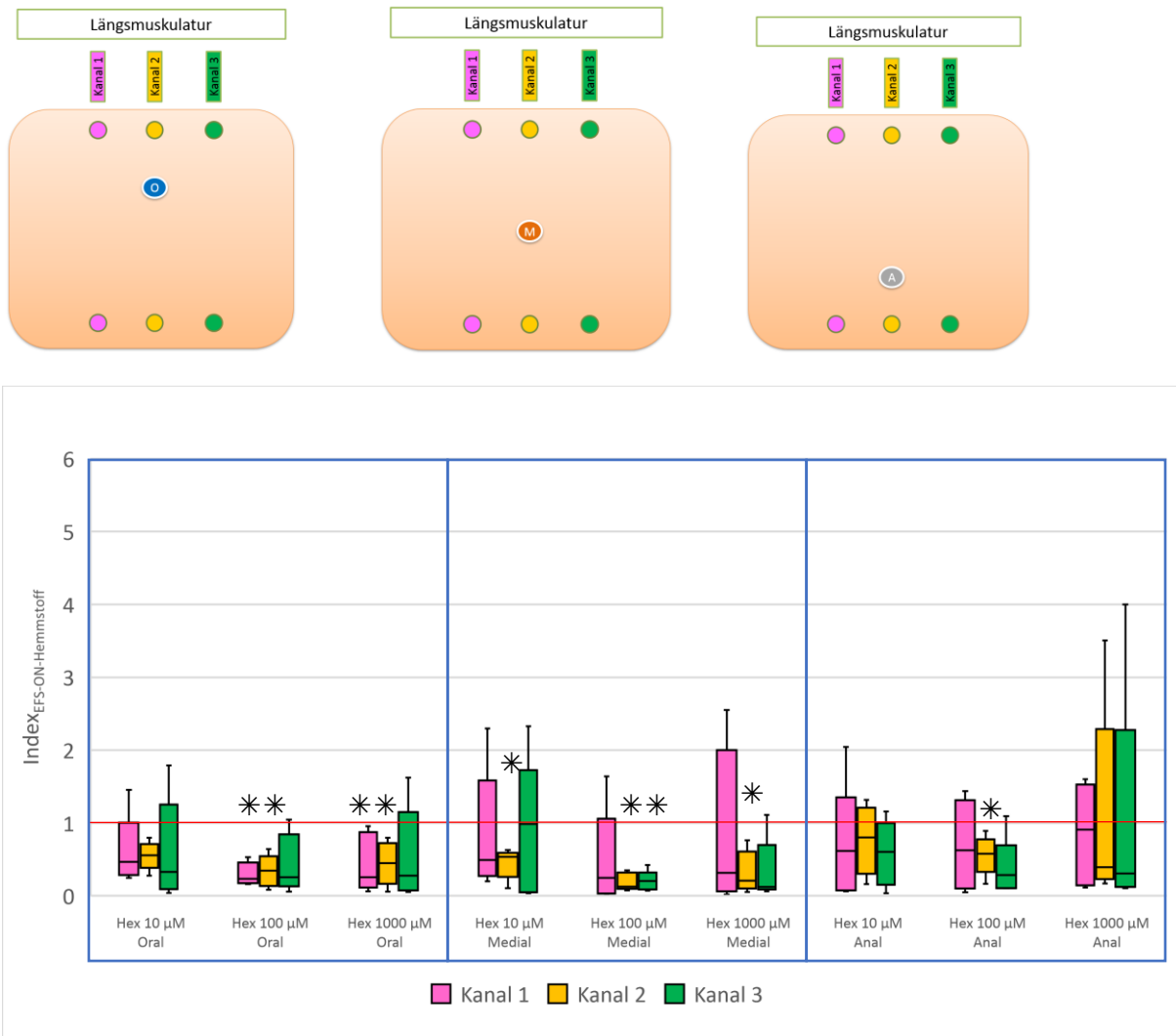


**Abb. 64:** Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) auf die ON Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.

In der Betrachtung der einzelnen Messkanäle für die LM unter Hex Einfluss, waren die Mediane der Indices der ON-Antworten generell unter 1. Für Kanal 2 waren die Indices bei oralem und medialem Stimulationsort signifikant < 1. Für die Kanäle 1 und 3 konnte nur vereinzelt Indices signifikant <1 ermittelt werden. Ein Zusammenhang der Indices der ON-Antworten mit dem Stimulationsort konnte für die LM nach Hexamethoniumgabe nicht festgestellt werden (Abb. 65 und 66).

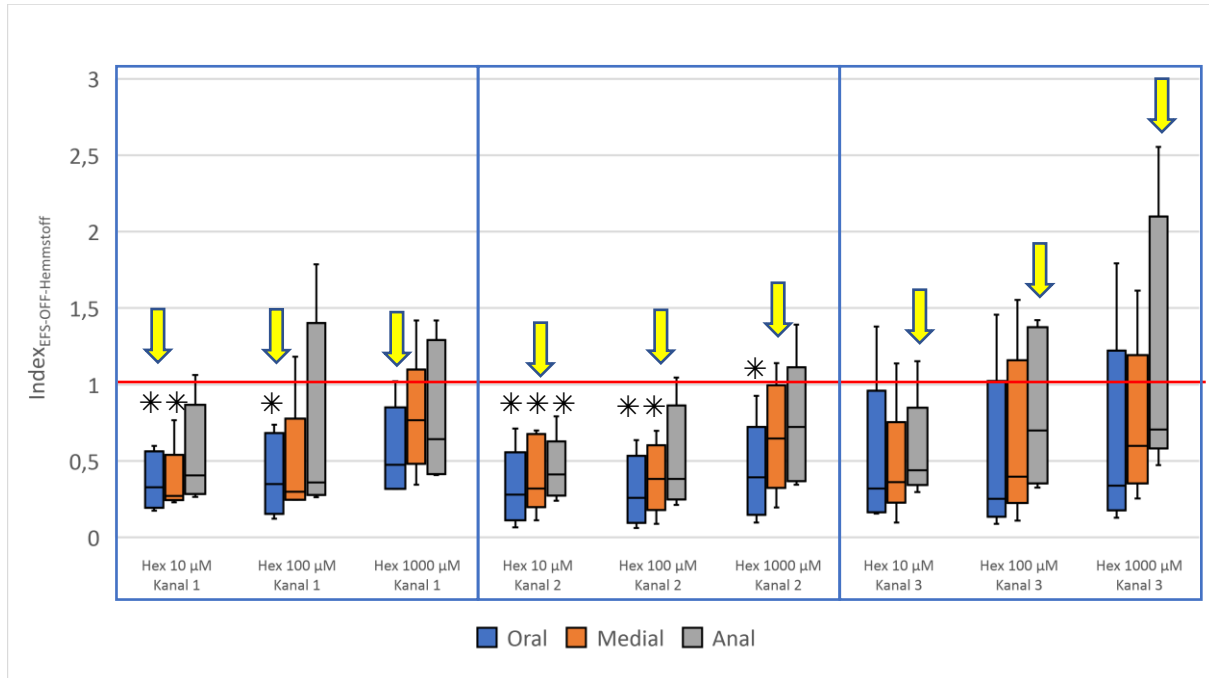
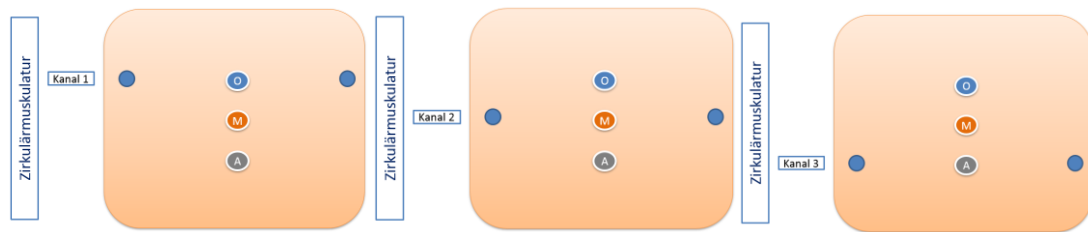


**Abb. 65: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) auf die ON Antworten der Längsmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC ( $\text{Index}_{\text{EFS-ON-Hemmstoff}}$ ) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



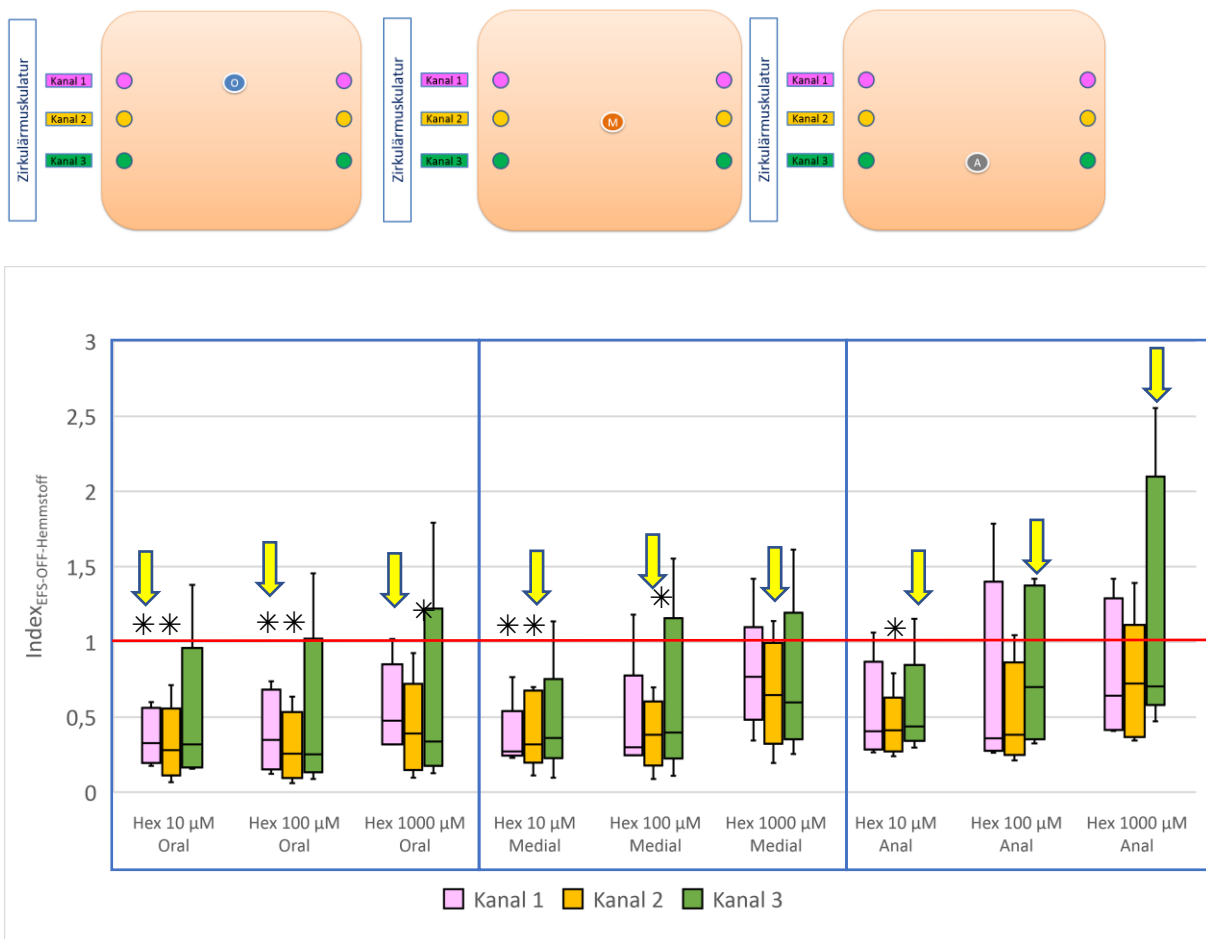
**Abb. 66: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM auf die ON Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration.** Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.

Eine Abhängigkeit der Indices vom Stimulationsort konnte unter Hex-Einfluss für die OFF-Antworten der ZM nicht festgestellt werden (Abb. 67-68). In der einzelnen Betrachtung der Messkanäle waren die Indices der OFF-Antworten der ZM nur vereinzelt, speziell unter Hex 10 und 100 µM signifikant <1. Der Index der OFF-Antworten der ZM lag generell im Median numerisch <1.



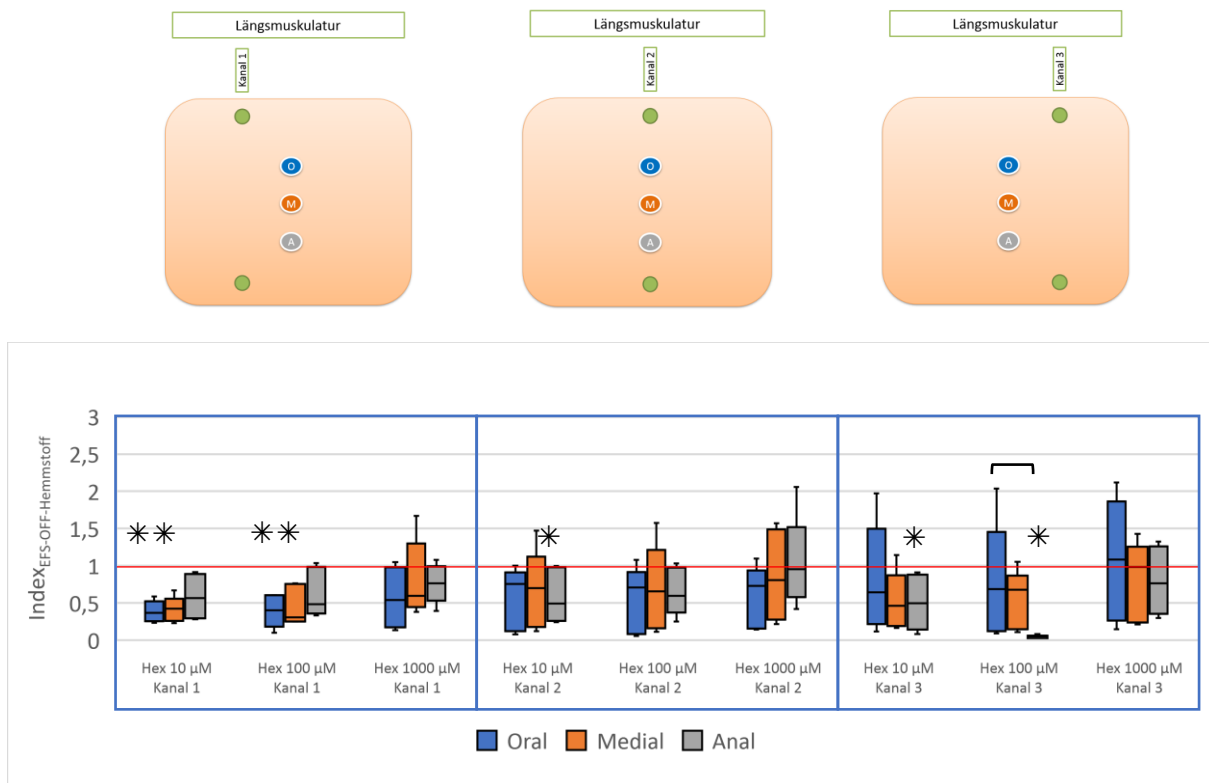
**Abb. 67: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.**



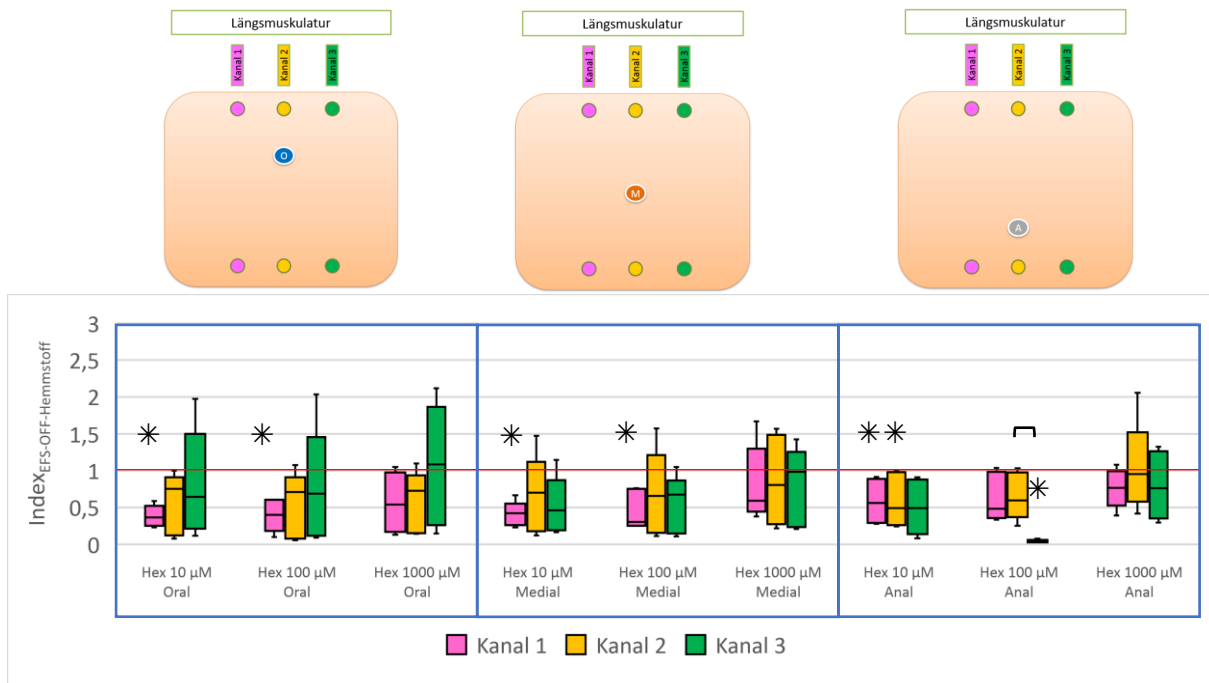


**Abb. 68:** Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM) auf die OFF Antworten der Zirkulärmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC ( $\text{Index}_{\text{EFS-OFF-Hemmstoff}}$ ) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration. Der gelbe Pfeil markiert den Balken, bei dem Messpunkt und Stimulationsort gleich sind. Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Einstichproben-test: Wilcoxon-Vorzeichen-rang-test, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.

Bei der Betrachtung der einzelnen Messkanäle für die OFF-Antworten der LM unter Hex Einfluss, waren die Mediane der Indices numerisch < 1 (Abb. 69-70). Eine signifikante Hemmung der OFF-Antwort (Index < 1) konnte für Kanal 1 unter 10µM Hex und unter 100µM Hex nach oraler und medialer Stimulation registriert werden. An Kanal 2 und 3 wurden bei anal gelegener Stimulation signifikant hemmende OFF-Antworten festgestellt. Lediglich an Kanal 3 war nach Applikation von 100µM Hexamethonium der Index bei oralem Stimulationsort signifikant höher als bei analem (Abb. 61). Zudem bestanden Unterschiede zwischen den Indices der OFF-Antworten der einzelnen Messkanäle an der LM bei analer Stimulation unter 100 µM Hex (Abb. 62). Hier war der für Messkanal 2 ermittelte Index im Median signifikant höher als der für Messkanal 3 (Abb. 62). Des Weiteren fiel bei der Betrachtung von Abb. 62 auf, dass insbesondere bei oraler Position der Stimulationselektrode, aber auch bei medialer Position, die Indices der OFF-Antworten im Median an Kanal 1 am niedrigsten waren und hin zu Kanal 3 im Median im numerisch zunahmen. Ein systematischer Zusammenhang zwischen Stimulationsort und EFS-Antworten konnte unter Hex-Einfluss nicht bzw. nicht so eindeutig wie unter L-Name-Einfluss registriert werden.



**Abb. 69: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM) auf die ON Antworten der Längsmuskulatur je Messkanal. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) gruppiert nach Messkanal (Kanäle 1-3) in Abhängigkeit vom Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration.** Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.



**Abbildung 70: Einfluss von Hex (Endkonzentration in Lösung: 10, 100, 1000 µM auf die ON Antworten der Längsmuskulatur in Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dargestellt sind die Indices der AUC (Index<sub>EFS-ON-Hemmstoff</sub>) der Ableitungen der Kanäle 1-3 gruppiert nach Stimulationsort (oral, medial, anal) und Hex-Konzentration.** Index < 1 = hemmend, Index > 1 = erregend in Relation zur Kontrolle. Index signifikant verschieden zu 1, markiert mit \*. Klammer = signifikanter Unterschied des Index zwischen den Stimulationsorten. Einstichprobentest: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, Unterschiede in Gruppen: Friedman-Test mit Post Hoc-Test nach Wilcoxon mit angepasstem Signifikanzniveau nach Bonferroni, N=5.

## 5 Diskussion

In dieser Studie wurde die Motilität des porcinen distalen Colons mithilfe einer eindimensionalen sowie einer zweidimensionalen Messmethode vergleichend untersucht. Neben der Spontanmotilität wurden auch der Einfluss intrinsischer Neurone sowie die Bedeutung cholinерger und nitrерger Neurotransmission auf die Aktivität der ZM und LM erfasst.

### 5.1 Methodendiskussion

Es gibt verschiedene Methoden zur Untersuchung der gastrointestinalen Motilität. In vitro wurde bislang vor allem mit Kraftmessern zur eindimensionalen Untersuchung einzelner Muskelstreifen gearbeitet (GRAHAM und SNEDDON 1993; KÖHN 2000; PFANNKUCHE 2004; MÜNNICH 2009; BROAD et al. 2014; LEFEBVRE et al. 2017). Diese Untersuchungsmethode hat den Vorteil, dass sie auch an kleinen Gewebestücken durchgeführt werden kann, die zu verwendenden Organbäder klein dimensioniert werden können und somit Organbadvolumina von wenigen Millilitern ausreichen. Allerdings muss auch bei der Messung an kleinen Präparationen in einer Dimension bedacht werden, dass es je nach Größe der zu untersuchenden Spezies einer Mindestgröße an Gewebe auf Grund der neuronalen Dichte im enterischen Nervensystem bedarf (GABELLA 1987).

Erst wenige Untersuchungen erfolgten bisher zweidimensional und simultan an Zirkulär- und Longitudinalmuskulatur (ROHN 2009, PFANNKUCHE 2004). Solche zweidimensionalen Messungen scheinen zunächst aufwändiger und schwerer zu standardisieren, haben aber den Vorteil, dass hierbei sowohl das Zusammenspiel zwischen ZM und LM, als auch spezifische Unterschiede zwischen den Muskelschichten erfasst werden können. Auch die im Allgemeinen größeren Gewebestücke, die bei solchen Messungen eingesetzt werden, haben insbesondere bei größeren Spezies den Vorteil, dass ausreichend enterische Ganglien im Präparat vorhanden sind (GABELLA 1987).

2006 entwickelte ich in meiner Diplomarbeit für Biomedizintechnik am Veterinär-Physiologischen Institut der Universität Leipzig und der Fachhochschule Jena, ein in-vitro-System, mit dem simultan zweidimensionale Motilitätsmessungen an jeweils drei benachbarten Messpunkten innerhalb eines Darmpräparates am porcinen Colon möglich wurden (OTTO 2006). Die Apparatur erlaubt neben der zweidimensionalen Erfassung der Kontraktionsmuster in lokal sehr begrenzten Bereichen mittels Elektrischer Feldstimulation evozierte Nerv-Muskel-Antworten hervorzurufen und diese zu erfassen. Dieses System, hier als Apparatur 2 bezeichnet, wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt und funktionell evaluiert. Es konnten sowohl spontane Motilitätsereignisse, als auch Nerv-Muskel-Antworten während und nach EFS an ZM und LM simultan aufgezeichnet werden. Weiterhin bot die Stimulation und Messung an drei verschiedenen Orten je Muskelschicht die Möglichkeit, den Einfluss länger projizierender myenterischer Neurone auf die Aktivität der Muskulatur einzugrenzen. ROHN (2009) ist der Einzige mir bekannte Autor, der in seiner Arbeit einen ähnlichen Aufbau im Setup allerdings am Magen des Meerschweinchens verwendet hat. ROHN (2009) hatte die Motilität der ZM simultan jeweils im Abstand von 1 cm an drei benachbarten Positionen betrachtet, die der LM wurde bei ihm allerdings nur an einer Position erfasst. Somit waren Aussagen über neuronale Projektionen mit seinem Aufbau auf die ZM und hier auf einen Bereich von max. 3 cm beschränkt. Der Nachteil in der Methode von ROHN (2006) liegt somit hauptsächlich in der geringeren Auflösung der Aktivitätserfassung an der Longitudinalmuskulatur.

Als Referenzmethode wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Apparatur 1 in Anwendung gebracht. Wie erwähnt, hat auch diese Messmethode ihre Vorteile, insbesondere, wenn nur kleine Gewebestücke zur Verfügung stehen, die aufgrund ihrer geringen Abmessungen nicht in der Apparatur 2 fixiert werden können. Daher war es von Interesse, ob die Ergebnisse aus den Apparaturen 1 und 2 qualitativ vergleichbar sind. Dieses hätte den Vorteil, dass zum einen die beiden Messmethoden parallel angewandt werden könnten, und auch schon bereits in der Literatur beschriebene Ergebnisse aus eindimensionalen Messungen als Grundlage für Untersuchungen mit Apparatur 2 dienen können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse von beiden Messapparaturen qualitativ gut vergleichbar sind. In einigen Punkten, insbesondere unter Hemmstoffeinfluss, kommt es jedoch teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. In den folgenden Abschnitten wird jeweils auf die mögliche Ursache der Unterschiede eingegangen.

Ein quantitativer Vergleich zwischen den Messergebnissen aus Apparatur 1 und 2 war nur begrenzt möglich. Dies lag darin begründet, dass die Größe der Darmpräparate in den beiden Setups sehr unterschiedlich war. So wurden in Apparatur 1 Muskelstreifen zur Messung der Motilität an der ZM in einer Größe von 2 cm in ZM-Richtung und 1 cm in LM-Richtung verwendet. Für die Betrachtung der Motilität an der LM wurden Darmpräparate mit 2 cm in LM-Richtung und 1 cm in ZM-Richtung verwendet. Die Abmessungen der Darmpräparate für Apparatur 2 betrugen hingegen 5 cm in jede Muskulaturrichtung. Diese Unterschiede in der verwendeten Gewebefläche haben zur Folge, dass zum einen verschieden große Anteile an kontraktile Muskulatur zur Messung vorhanden sind und damit verschieden große Kontraktionsamplituden entstehen können. Zum anderen ist die effektive Anzahl an enterischen Neuronen je Gewebestück ebenfalls verschieden und kann zu abweichenden Ergebnissen führen. Um letztlich dennoch einen quantitativen Vergleich zwischen den Messergebnissen aus beiden Apparaturen anführen zu können, wurden die Messergebnisse aus beiden Setups in einen Relativwert, hier als Index bezeichnet, umgerechnet und gegenübergestellt. Hierbei ließ sich ebenfalls feststellen, dass die Ergebnisse aus Apparatur 1 und 2 quantitativ nach Bildung des Relativwertes „Index“ gut vergleichbar sind, jedoch wie oben schon im qualitativen Vergleich erwähnt, die Ergebnisse unter Hemmstoffeinfluss teilweise entgegengesetzt in Apparatur 1 und 2 ausfallen.

Neben den unterschiedlichen Dimensionen der eingespannten Gewebestücke, bestanden auch hinsichtlich der Befestigung der Gewebe in den beiden Setups Unterschiede. In Apparatur 1 wurden die Gewebe entlang der zu betrachtenden Muskulaturrichtung fixiert und die zweite Muskulaturrichtung, je nach dem ZM oder LM, wurde nicht mechanisch beansprucht. Hingegen wurden die Darmpräparate in Apparatur 2 stets entlang beider Muskulaturrichtungen für jeweils drei benachbarte Punkte fixiert und somit gleichzeitig mechanisch beansprucht. Interferenzen oder Beeinflussungen in der Motilitätsmessung durch Kontraktion oder Relaxation der jeweils anderen Muskulaturrichtung in Apparatur 2 können allerdings ausgeschlossen werden, da es sich in beiden Setups um isometrische Messverfahren handelt. Dies wurde schon im Rahmen meiner Diplomarbeit dahingehend geprüft und verifiziert (OTTO 2006).

## **5.2 Diskussion der Messergebnisse von Apparatur 1 und 2**

### **5.2.1 Spontanmotilität**

#### **5.2.1.1 Kontrollbedingungen**

Beide Messapparaturen waren technisch in der Lage, spontane Motilitätsereignisse des distalen porcinen Colons aufzuzeichnen. Aus den Werten wurden AUC und SD berechnet. Die AUC schließt bei ihrer Berechnung sowohl Amplitude als auch Frequenz der Muskelkontraktionen mit ein. Sie sollte damit für die Bewertung der Spontanmotilität im Bemessungszeitraum ein Ausdruck für die „Stärke“ dieser sein. Der Parameter SD (Standardabweichung) beschreibt die mittlere Schwankung der Messwerte um den Mittelwert und sollte hier als zusätzlicher Parameter die Spontanmotilität in ihrer „Agilität“ beschreiben.

Die LM zeigte im Parameter AUC unter Kontrollbedingungen an beiden Apparaturen höhere Werte als die ZM. In der Ableitung des Variationskoeffizienten unterschieden sich aber weder ZM und LM noch Apparatur 1 und 2. Hieraus lässt sich zum einen ableiten, dass beide Messapparaturen für die Betrachtung der Spontanmotilität qualitativ gleichwertige Ergebnisse liefern. Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass die LM eine stärkere Spontanmotilität (AUC) aufweist als die ZM.

Die stärkere Spontanmotilität der LM im Vergleich mit der ZM wird durch eine Studie von HUIZINGA et al. (1983) bestätigt, in der ebenfalls ZM und LM am porcinen Colon in einem Versuchsansatz verglichen wurden. So zeigten die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe eine signifikant höhere Dauer und Amplitude (Kraft in g) der Spontankontraktionen an der LM gegenüber der ZM bei simultanen Motilitätsmessungen an Längs- und Zirkulärmuskulatur des porcinen Colons.

Die am porcinen Colon erhobenen Befunde scheinen sich allerdings nicht generell im Colon anderer Spezies replizieren zu lassen. KÖHN (2000) untersuchte in ihrer Dissertation in-vitro die Dünn- und Dickdarmmotilität des Pferdes. Sie konnte unter basalen Bedingungen am equinen Colon eine signifikant niedrigere Kontraktionsfrequenz der LM im Vergleich zur ZM feststellen, bei den anderen von ihr gemessenen Parametern wie Kontraktionsaktivität, Kontraktionsamplituden u.a. konnten während der Spontanmotilität keine Unterschiede zwischen den Muskulaturschichten festgestellt werden. Es bleibt somit fraglich ob die stärkere Spontanmotilität der LM im Vergleich zur ZM ein spezifisches Phänomen des porcinen Colons darstellt. Um detailliertere Speziesvergleiche durchführen zu können, wäre es notwendig auch bei weiteren Spezies die Motilität beider Muskelschichten im Colon in einem Versuchsansatz zu erfassen.

#### **5.2.1.2 Hemmstoffeinfluss**

Die Erzeugung spontaner Darmkontraktionen und ihre räumliche wie auch zeitliche Organisation hat einen intrinsisch autonomen Ursprung. Die glatten Muskelzellen sowie die enterischen Neurone sind im Zusammenspiel hauptverantwortlich für die autonome Funktion und Regulation der Darmmotilität. Eingaben aus extrinsischen Quellen wie sympathische und parasympathische Nervenfasern, parakrine, endokrine und exokrine Hormone, Entzündungsmediatoren oder Stressmediatoren beeinflussen die myogene und enterische neuronale Steuerung nur modulierend, um die Motilitätsmuster Veränderungen im Gesamtorganismus anzupassen (SARNA 2010).

Um die Beteiligung intrinsischer cholinerg und nitrerger Komponenten in der Kontrolle der Darmmotilität zu verifizieren, wurden die Hemmstoffe Atropin, L-Name und Hexamethonium eingesetzt.

#### 5.2.1.2.1 Charakterisierung muskarinerner Einflüsse auf die Spontanmotilität mittels Atropin

Einer der wichtigsten erregenden Neurotransmitter in der Regulation der Darmmotilität durch das ENS ist Acetylcholin. Dieser wird von sensorischen Neuronen, erregenden Interneuronen und erregenden (aszendierenden) Muskelmotoneuronen gebildet und bindet auf der Darmmuskulatur in der Hauptsache an muskarinerge Rezeptoren des Typs M3 und auf enterischen Nervenzellen sowohl an muskarinergen wie auch nicotinergen Rezeptoren (PFANNKUCHE und SCHEMANN 2015, HARRINGTON et al. 2010, KURZEN et al. 2007).

Die Applikation von Atropin sollte dazu dienen, abzugrenzen, zu welchen Anteilen die Spontanmotilität der Muskulatur direkt von cholinergen enterischen Nervenzellen oder von noch im Präparat vorhandenen parasympathischen Fasern moduliert wird.

Atropin schien in unserer Studie einen hemmenden Einfluss auf die AUC der Spontanmotilität zu haben. Dies zeigte sich in Indices, die immer numerisch  $< 1$  waren, auch wenn der Unterschied des Indexwertes von 1 nicht für alle Präparationen und Konzentrationen als signifikant zu untersetzen war. Auch bei der Agilität der Spontanmotilität in Form der SD blieben bei den in Apparatur 2 gewonnenen Werten die Indices unter Atropin für die ZM und LM stets numerisch  $< 1$ , wenn auch nicht signifikant.

Diese Befunde weisen zunächst auf eine zumindest teilweise hemmende Wirkung von Atropin auf die Spontanmotilität beider Muskelschichten hin. Diese Wirkung lässt sich durch eine Bindung von Atropin an muskarinerge Rezeptoren an der glatten Muskulatur erklären (FREISSMUTH et al. 2020, FREY 2009). Dies blockiert die Bindung von Acetylcholin an die entsprechenden Rezeptoren und somit die Induktion von Aktionspotentialen in der Muskulatur (FREY 2009, SINGH und MANDAL 2013, VENTURA-MARTINEZ et al. 2017).

Eine hemmende Wirkung von Atropin an der Muskulatur des Colons konnte bereits in anderen Untersuchungen gezeigt werden: bei HUIZINGA et al. (1983) wurde an der ZM des porcinen Colons, wie bei den hier vorliegenden Untersuchungen, durch Atropin eine partielle Hemmung der Spontanaktivität induziert. Hierbei nahm sowohl die Frequenz der phasischen Kontraktionen, als auch deren Amplitude ab. Auch FUJIMOTO et al. (2010) fanden in ihren Untersuchungen an der LM des Meerschweinchen-Colons, dass Atropin die Spontanmotilität in Amplitude und Frequenz erniedrigt.

Insgesamt lässt sich von unseren und anderen Befunden ableiten, dass Atropin zwar einen hemmenden Einfluss auf die Spontanmotilität im Colon hat, es aber zu keiner vollständigen Hemmung der Motilität führt. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die spontane Motilität an ZM und LM nur teilweise muskarinerner Steuerung unterliegt. Diese muskarinerge Steuerung richtet sich nach Art und Lokalisation von muskarinergen Rezeptoren auf der glatten Muskulatur und vermutlich auch in geringem Maße auf den Nervenzellen des enterischen Nervensystems (HARRINGTON et al. 2010).

Da Atropin sämtliche muskarinergen ACh-Rezeptortypen blockiert (mAChR) (FREISSMUTH et al. 2020, FREY 2009), kann aus der vorliegenden Untersuchung nicht festgestellt werden, welche Rezeptorsubtypen bei der Steuerung der Spontanmotilität im porcinen Colon eine Rolle spielen. Generell sind im Darm fünf mAChR-Subtypen bekannt (HARRINGTON et al. 2010). Diese stimulieren bei ACh-Bindung an M1, M3, M5 die Phosphoinositol-Kaskade, während an M2 und M4 eine Hemmung der Adenylylcyclase bewirkt wird (Harrington et al. 2010). Der Großteil an mAChR Rezeptoren ist auf der Muskulatur lokalisiert und scheint auch die größte Bedeutung bei der Steuerung der cholinergen Steuerung der intestinalen Muskulatur zu

spielen (BUCKLEY und BURNSTOCK 1984; BUCKLEY und BURNSTOCK 1986; HARRINGTON et al. 2010). Funktionell scheint hier insbesondere der M3 Subtyp die wesentlichste Rolle inne zu haben (MATSUI et al. 2002; UCHIYAMA und CHESS-WILLIAMS 2004).

Allerdings befinden sich auch auf neuronalen Strukturen mAChR (KILBINGER und WESSLER 1980; TAKEUCHI et al. 2007). Diese neuronalen-mAChR und ihre Rolle innerhalb des ENS ist noch nicht so gut charakterisiert. M1, M2 und M3 mAChR wurden an einer Reihe verschiedener Spezies unter Verwendung immunhistochemischer Verfahren an Muskulatur, myenterischen und submukosalen Ganglien, Neuronen im Zirkulärmuskel und in Ganglien an Schleimhautepithelzellen wie auch an submukosalen Blutgefäßen identifiziert (HARRINGTON et al. 2010). M4 und M5 mAChR und deren Expression im Darm ist nicht eindeutig geklärt. Es gibt keine Studien, die darauf hinweisen, dass M5 innerhalb des ENS lokalisiert sind. M4 wurden auf myenterischen Neuronen nachgewiesen, wo sie die ACh-Freisetzung regulieren (HARRINGTON et al. 2010). Die Wirkung von ACh auf die Muskelantwort ist somit prinzipiell nicht nur auf die mAChR auf der Muskulatur zurückzuführen, sondern auch auf die durch mAChR vermittelte Transmitterfreisetzung aus Neuronen, welche auf Muskelzellen projizieren (KILBINGER und WESSLER 1980; TAKEUCHI et al. 2007). M1 und M3 Rezeptoren wurden auf Neuronen nachgewiesen, welche an die Längsmuskulatur projizieren und M1 und M2 Rezeptoren auf Neuronen welche an die Zirkulärmuskulatur projizieren (DIETRICH und KILBINGER 1995; KILBINGER und WAGNER 1975; SOEJIMA et al. 1993). Welche der auf Neuronen lokalisierten mAChR Subtypen letztendlich eine Rolle in der vorliegenden Untersuchung spielen könnten, bleibt aber offen.

Neben der hemmenden Wirkung von Atropin auf die Colonmuskulatur in Apparatur 2 konnte an Apparatur 1 für die LM und z.T. auch für die ZM eine Steigerung der SD unter Atropinwirkung gefunden werden. Zunächst ist dieser Befund unerwartet und lässt sich mit der oben beschriebenen Blockade der M3 Rezeptoren auf der Muskulatur nicht plausibel erklären. Bei der erregenden Wirkung von Atropin könnten allerdings Acetylcholinrezeptoren eine Rolle spielen, die auf neuronalen Strukturen, insbesondere im myenterischen Plexus lokalisiert sind. Hier kämen neben den oben beschriebenen mAChR auch nikotinerge Rezeptoren in Frage. Diese konnten bereits auf verschiedenen neuronalen Populationen im myenterischen Plexus nachgewiesen werden (HARRINGTON et al. 2010; GALLIGAN und NORTH 2004) und sind hier ein Angriffspunkt für cholinerge Interneurone (HARRINGTON et al. 2010). Obwohl Atropin üblicherweise als Hemmstoff für muskarinerge Rezeptoren beschrieben wird, konnte in verschiedenen Studien bereits gezeigt werden, dass in höheren Konzentrationen auch eine Bindung an nikotinerge Rezeptoren erfolgt. So fanden Bader und Diener 2015 eine Blockade von epithelialen Nicotinrezeptoren durch Atropin. Eine Studie von Parker et al. 2003 zeigte ebenfalls, dass Atropin in höheren Konzentrationen als 10 µM auch an nicotinerge Rezeptoren an adulten *Xenopus laevis* Oozyten und Neuronen der medialen Habenula aus Ratten bindet. In einer Arbeit von KURZEN et al. 2007 wird ebenfalls deutlich, dass Atropin auch an nicotinergen Acetylcholinrezeptoren als Antagonist binden kann, dies allerdings erst in höheren Konzentrationen als beispielsweise Hexamethonium. Keine der derzeit mir verfügbaren Quellen beschreibt, dass Atropin an nicotinerge Rezeptoren des myenterischen Plexus bindet, diese Vorstellung ist durch die oben genannten Arbeiten und unsere Befunde allerdings denkbar und wird durch die Befunde nach Hexamethonium-Applikation gestützt (siehe dazu auch Punkt 5.2.1.2.3.). Die Blockade nicotinerger ACh-Rezeptoren durch Hexamethonium führte an der LM in der Apparatur 1 zu einer Verstärkung der Spontanmotilität, vergleichbar mit der Zunahme der Spontanmotilität unter höheren Atropin-Konzentrationen.

Eine Blockade nicotinerger Rezeptoren durch Atropin oder Hexamethonium könnte verschiedene Wirkungen nach sich ziehen, die im Folgenden erläutert werden.

Es ist bekannt, dass myenterische Interneurone sowohl erregende, als auch hemmende Motoneuronen in myenterischen Ganglien stimulieren können. Ungefähr 90 % der aufsteigenden Interneurone und 50 % der absteigenden Interneurone sind cholinerg und über Nikotinrezeptoren mit anderen myenterischen Neuronen verschalten (GRIDER 1989, FRANTZIDES et. al. 1987, SARNA et. al. 1981). Folglich blockieren nikotinerge Antagonisten wie Hexamethonium die orale oder anale Übertragung sowie die Stimulation von Motoneuronen in zirkumferentieller Richtung (GRIDER 1989, FRANTZIDES et. al. 1987, SARNA et. al. 1981). Die cholinergen Interneurone, welche mit hemmenden Motoneuronen verschaltet sind, bewirken folglich eine Hemmung von Kontraktionen (HARRINGTON et al. 2010). Diese Hemmung könnte durch die Blockade nikotinerger Rezeptoren vermindert werden, was zu einer Steigerung der Muskelaktivität führen würde.

#### *5.2.1.2.2 Charakterisierung nitrerger Einflüsse auf die Spontanmotilität mittels L-NAME*

Für die Regulation der gastrointestinalen Motilität ist NO der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter (WOOD 1994). Diese Wirkung wird über den NO-sensitiven Guanylylcyclase (NO-GC)-Rezeptor vermittelt, welcher im Gastrointestinaltrakt in verschiedenen Zelltypen wie glatten Muskelzellen und ICC exprimiert wird (BECK et al. 2018). In der eigenen Arbeit erfolgte zur Untersuchung nitrerger Mechanismen an der Spontanmotilität eine Inkubation der Gewebe mit L-NAME in den Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$ . L-NAME hemmt nichtselektiv die nNOS und damit die Bildung und Freisetzung von NO aus nitrergen Nervenzellen (BENABDALLAH et al. 2008; MOORE und HANDY 1997). Da NO über den NO-GC-Rezeptor zu einer NO-induzierten Erhöhung des cGMP-Spiegels in der Muskelzelle und letztlich zu einer Relaxation dieser Muskelzelle führt, wurde erwartet, dass die Motorik unter L-NAME gesteigert wird.

L-NAME hatte bei der vorliegenden in vitro Untersuchung am isolierten Schweinedarm auf die Spontanmotilität keinen signifikanten Einfluss, weder an ZM noch an LM. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nitrerger Mechanismen keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Spontanmotilität haben.

Kongruent zu unseren Ergebnissen hatten RAE et al. (1998) die ZM des menschlichen Colons isoliert untersucht. Die Autoren kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die unter Kontrollbedingungen vorhandenen rhythmischen Kontraktionen durch Zugabe von L-NAME nicht beeinflusst wurden.

Obwohl die Beteiligung nitrerger Neurone an der Kontrolle der Spontanmotilität in dieser Studie vermutlich nicht relevant ist, fiel auf, dass L-NAME die berechneten Indices zumindest numerisch beeinflusste und zwar die an der Apparatur 1 gewonnenen Werte anders als die an der Apparatur 2 gewonnenen. In den aus den Daten der Apparatur 2 abgeleiteten Indices waren die unter L-NAME festgestellten Werte für ZM und LM im Median stets numerisch  $< 1$ . Hingegen waren die aus den Daten der Apparatur 1 abgeleiteten Indices für die LM für die L-NAME Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$  stets  $> 1$  und die für die ZM in allen L-Name Konzentrationen stets  $< 1$ . Die Unterschiede der aus den Daten der beiden Apparaturen abgeleiteten Indices waren insbesondere bei den an der LM gewonnenen Werten auffällig. Hier scheint es so zu sein, dass in Apparatur 1 L-NAME eher erregend und in Apparatur 2 eher hemmend auf die gemessene Spontanmotilität wirkte. Dies könnte an der unterschiedlichen Größe der verwendeten Gewebestücke in Apparatur 1 und 2 liegen. Die Gewebestücke in Apparatur 1 waren deutlich kleiner als die in Apparatur 2 und beinhalteten daher nur kurz projizierende Neurone. Es ist anzunehmen, dass letztere die Sensitivität auf L-Name Applikation vermitteln. Dies zeigte auch bei der Wirkung von L-Name auf EFS-induzierte Kontraktionen und wird daher unter 5.2.2.2.2 genauer diskutiert.



#### 5.2.1.2.3 Charakterisierung nicotinerger Einflüsse auf die Spontanmotilität mittels Hexamethonium

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung nicotinerger Mechanismen die Gewebe mit Hexamethonium in aufsteigender Konzentration (10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Hexamethonium ist ein nicotinerger Acetylcholin-Rezeptor-Antagonist und bindet, speziell in autonomen Ganglien, an diesen Rezeptor, wodurch eine Erregungsübertragung gehemmt wird (FREY 2009). Mittels Hexamethonium sollte also in der eigenen Untersuchung die Kommunikation zwischen enterischen Neuronen unterbunden werden, da diese größtenteils über nicotinerge Rezeptoren kommunizieren (WOOD 1994).

Mit beiden Apparaturen und an beiden Muskulaturen konnte für die Spontanmotilität eine Hexamethoniumsensitivität festgestellt werden. Der Einfluss von Hexamethonium war, gemessen mit Apparatur 2, für beide Muskulaturrichtungen leicht hemmend (Indices numerisch  $<1$ ). Diese leichte Hemmung der Spontanmotilität durch Hexamethonium lässt auf eine Beteiligung cholinergischer Interneurone in der Stimulation der Spontanmotilität schließen. Mit Apparatur 1 konnte diese Hex. induzierte Hemmung der ZM bestätigt werden. Im Unterschied zu App. 2 hatte in App. 1 Hexamethonium auf die Spontanmotilität der LM aber einen erregenden Einfluss (Indices für die AUC und SD stets  $>1$ , für die SD in den Konzentrationen 100 und 1000  $\mu\text{M}$  signifikant). Dieser Unterschied im Hexamethonium-Einfluss zwischen Apparatur 1 und 2 war für die Spontanmotilität der LM in 2 von 6 möglichen Fällen signifikant.

Neben den oben im Abschnitt zum Einfluss hoher Atropin-Konzentrationen diskutierten Möglichkeiten der Beteiligung hemmender Interneurone, die über nicotinerge Rezeptoren stimuliert werden, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Messmethoden auch durch die unterschiedliche Art der Gewebebefestigung bedingt sein. In Apparatur 2 werden ZM und LM einer mechanischen Spannung ausgesetzt und diese könnte im Gegensatz zur Befestigung in Apparatur 1 über mechanische Stimuli zu einer veränderten Hexamethonium-Sensibilität führen. Des Weiteren könnte, wie schon bei der Betrachtung der Spontanmotilität unter L-Name Einfluss (5.2.1.2.2) diskutiert, auch die unterschiedliche Größe der verwendeten Darmpräparate in Apparatur 1 und 2 und damit verbunden eine unterschiedliche Anzahl an myenterischen Motor- und Interneuronen pro Gewebestück bzw. Populationen mit unterschiedlichen Projektionslängen ein Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Die Wirkung von Hexamethonium auf die Spontanmotilität im Gastrointestinaltrakt scheint spezie- und lokalisationsabhängig zu sein. Bei der Maus hemmt Hexamethonium im Colon die großen Kontraktionen, welche neurogenen Ursprungs sind, hat aber auf langsame phasische Kontraktionen welche wahrscheinlich myogenen Ursprungs sind keinen Einfluss (BECK et al. 2018, HIBBERD et al. 2017). Im Jejunum anästhesierter Ratten führte es nach intravenöser Gabe zu einer langanhaltenden Blockade der Motilität (BOGESKI et al. 2005). Auch bei Knochenfischen wurde eine Blockade der Peristaltik durch Hexamethonium festgestellt (BURNSTOCK 1958). In den Untersuchungen von CARBONE et al. (2013) am humanen Colon hatte Hexamethonium keinen Effekt auf die Amplitude der langsamen phasischen Kontraktionen, aber es reduzierte ihre Frequenz.

In unseren Untersuchungen ließ sich anhand der Hexamethonium-Empfindlichkeit feststellen, dass die Spontanmotilität am porcinen Colon in geringen Anteilen nicotinerger neurogener Einflüsse unterliegt. Inwiefern hier Interneurone einen erregenden oder hemmenden Einfluss haben, lässt sich nicht definitiv beantworten.

Insgesamt zeigen die Befunde aus den Untersuchungen zur Spontanmotilität, dass Apparatur 2 in der Lage ist, die Spontanmotilität von beiden Muskulaturrichtungen getrennt voneinander und an drei Messpunkten je Muskulaturrichtung zu registrieren. Wir konnten feststellen, dass die Spontanmotilität insgesamt kaum cholinergen und nitrerger Einflüssen unterliegt. Um zukünftig mit dieser Apparatur die Regulation der Spontanmotilität weiter zu charakterisieren, wäre es sinnvoll, die registrierten Motilitätsmuster in Anlehnung an SARNA (2010) in rhythmisch phasische Kontraktionen, ultrapropulsive Kontraktionen sowie tonische Kontraktionen zu unterteilen und zu bewerten. Dies ist mit dem derzeitigen Aufbau von Apparatur 2 nicht möglich. Um diese Bewertungen zu ermöglichen, könnte für Untersuchungen zur Darmmotilität beim Schwein Apparatur 2 baulich derart verändert werden, dass Motilitätsmuster über einen Bereich von mindestens 20 cm beurteilt werden können. Erst dann lassen sich Muster in der Spontanmotilität zeitlich und räumlich differenziert betrachten (SARNA 2010). Als zusätzliche Parameter zur Beurteilung der Spontanmotilität sollten Frequenz, Amplitude und Dauer der Motilitätsmuster als zeitliche Eigenschaften und für die räumliche Bewertung die Ausbreitungsrichtung sowie Entfernung der Ausbreitung eines Motilitätsmusters herangezogen werden. Aufgrund des größeren Betrachtungsfeldes würde es dann möglich sein, abzuleiten, ob es sich um Kontraktionsmuster handelt, welche die Ingesta vorantreiben, sie durchmischen, oder beides tun.

## **5.2.2 Nerv-Muskel-Antworten nach Elektrischer Feldstimulation**

### **5.2.2.1 Kontrollbedingungen**

Es konnte gezeigt werden, dass beide Messapparaturen in der Lage sind, EFS-induzierte lokale Nerv-Muskel-Reaktionen (ON- und OFF-Antworten) reproduzierbar zu registrieren. Sowohl die ON- und als auch OFF-Antworten wurden in beiden Messapparaturen unter Kontrollbedingungen stets als ON- bzw. OFF-Kontraktionen registriert. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die registrierten ON-Antworten im Vergleich zu den OFF-Antworten sehr gering ausgeprägt waren.

Die durch elektrische Feldstimulation hervorgerufenen Nerv-Muskel-Antworten sind auf eine Aktivierung exzitatorischer und inhibitorischer Neurone des myenterischen Plexus sowie im Präparat vorhandener Anteile extrinsischer Neurone zurückzuführen (ROHN 2009). Eine direkte Aktivierung der Muskulatur sollte durch die gewählten Stimulationsparameter (50 V Rechteckimpulse, Impulsbreite 0,5 ms, Frequenz 20 Hz, Stimulationsdauer 10 s) dabei ausgeschlossen sein. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen bestätigen, dass die verwendete Elektrische Feldstimulation ausschließlich TTX-sensitive Muskelreaktionen hervorruft, wodurch wir davon ausgehen müssen, dass diese Antworten nur durch Erregung neuronaler Strukturen induziert wurden.

Mit Apparatur 2 bestand zudem die Möglichkeit einer räumlichen Betrachtung der EFS-Antworten separat für die ZM und LM. Es ließ sich analysieren, in welche Richtung und in welcher Quantität sich EFS-Antworten von der Stimulationsstelle fortpflanzen. Durch Voruntersuchungen konnte mit Apparatur 2 (Punkt 4.1.2) gezeigt werden, dass die EFS lokal begrenzt wirkt und eine unspezifische Wirkung der EFS über den Stimulationsort hinaus nicht gegeben ist. Vielmehr wurden die Muskelantworten, die nicht unmittelbar an der Stimulationsstelle auftraten, durch neuronal weitergeleitete Stimuli induziert. Dies wurde dadurch belegt, dass die Muskelantworten auf EFS nach Durchtrennung des Gewebes und somit auch des myenterischen Plexus nur noch in unmittelbarer Nähe des Stimulationsortes auftraten.

Die durch EFS erzeugten Nerv-Muskel-Antworten waren unter Kontrollbedingungen abhängig vom Stimulationsort. Dies galt insbesondere für die OFF-Antworten der ZM. Hier ließ sich feststellen, dass bei oral gelegenen Stimulationsort die anal davon gelegenen Messkanäle mit einer signifikant niedrigeren OFF-Kontraktion auf eine EFS reagierten. Wenn der Stimulationsort hingegen anal gelegen war, reagierten die oralen Messorte mit einer signifikant höheren OFF-Kontraktion als die Messstelle direkt am Stimulationsort. Damit konnte funktionell belegt werden, dass oral einer Stimulationsstelle die Wirkung erregender Neurone überwiegt und anal einer Stimulationsstelle die Wirkung hemmender Neurone zunimmt. Hierin könnten funktionelle Parallelen zum Peristaltischen Reflex gesehen werden.

Bei Untersuchungen am Magen des Meerschweinchens konnten durch ROHN (2009) ähnliche, wenn auch nicht komplett vergleichbare, Ergebnisse in Folge EFS gefunden werden. Bei der initialen (ON-) Antwort lag eine Kontraktion vor, die oral vom Stimulationsort stärker war als aboral davon. Bei der späten (OFF-) Antwort lag hingegen eine Relaxation vor, welche in Richtung anal stärker ausgeprägt war als oral des Stimulationsortes (ROHN 2009). Sarna (2010) und ROHN (2009) führen an, dass oral eines definierten Punktes verhältnismäßig mehr exzitatorische Nervenzellen enden und in anale Richtung verhältnismäßig mehr Neurone mit inhibitorischen Eigenschaften.

#### *5.2.2.2 Hemmstoffeinfluss*

##### *5.2.2.2.1 Charakterisierung muskarinerger Einflüsse auf die EFS-Antworten mittels Atropin*

Die Applikation von Atropin sollte zeigen, ob die ON- und OFF-Antworten der Muskulatur direkt durch cholinergen enterische Muskelmotorneurone oder durch noch im Präparat vorhandene parasympathischen Fasern induziert werden. Es war zu erwarten, dass die unter Kontrollbedingungen messbaren ON- und OFF-Kontraktionen durch Atropin reduziert werden. Von weiterem Interesse war, inwiefern die Atropinwirkung vom Stimulationsort und somit von Projektionspolarität abhängig ist, da cholinerge myenterische Nervenzellen in der Hauptsache nach oral projizieren sollten (PORTER et. al. 1997, SARNA 2010).

##### *Atropin-Sensitivität auf die EFS-Antworten an ZM und LM Vergleichend in Apparatur 1 und 2*

In der Gegenüberstellung der ON- und OFF-Antworten zwischen Apparatur 1 und 2 unter Atropin konnte festgestellt werden, dass die ON-Antworten in beiden Messapparaturen und beiden Muskulaturschichten nicht Atropin - sensitiv waren. Nur in Apparatur 1, hemmte Atropin in einer Konzentration von 100  $\mu$ M die ON-Antwort der LM im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Abb. 34). Darum ist davon auszugehen, dass muskarinerge Rezeptoren nicht an der Vermittlung der ON-Antworten beider Muskulaturschichten beteiligt waren. An den OFF-Antworten gemessen mit Apparatur 2 konnte an der ZM ebenfalls kein signifikanter Atropin-Effekt direkt am Stimulationsort (Kanal 2) beobachtet werden. Die OFF-Antworten der LM – ebenfalls gemessen mit Apparatur 2 - hingegen wurden in 2 von 3 Fällen signifikant gehemmt, am deutlichsten in der Konzentration von 10  $\mu$ M. Die Atropin-induzierte Hemmung der OFF – Antwort konnte mit Apparatur 1 für die ZM bestätigt werden. Auf die LM in Apparatur 1 schien Atropin eine geringgradig erregende Wirkung zu haben, (Index im Median mit zunehmender Atropin-Konzentration > 1). Die Ergebnisse legen nahe, dass die OFF-Antworten der LM in Apparatur 2 zu einem deutlichen Anteil durch muskarinerge Neurotransmission gesteuert werden. Die leicht erregende Wirkung auf die OFF-Antworten der LM mit zunehmender Atropin-Konzentration in Apparatur 1 könnte, ähnlich wie schon beim Einfluss von Atropin auf die Spontanmotilität diskutiert, auf eine Blockade nicotinerger AChR an hemmenden Interneuronen durch hohe Atropinkonzentrationen hinweisen.

### *Atropin-Sensitivität auf die EFS-Antworten an ZM und LM in Apparatur 2 in Abhängigkeit des Stimulationsortes*

An einzelnen Messkanälen an der ZM in Apparatur 2 konnte eine signifikante Hemmung der OFF-Kontraktionen durch Atropin in den Konzentrationen 10 und 50  $\mu\text{M}$  festgestellt werden. Diese Hemmwirkung war unabhängig vom Ort der Stimulation. Hierdurch kann vermutet werden, dass die muskarinerg getragenen OFF-Antworten nicht nur durch eine Neuronengruppe mit spezifischer Projektionsrichtung (z.B. aufsteigende cholinerge Motoneurone) induziert wird, sondern vermutlich verschiedene Populationen cholinergischer Nervenzellen mit unterschiedlichen Projektionspräferenzen involviert sind. Wie schon in den vorigen Abschnitten diskutiert, könnte sich hier aber auch die Hemmung nikotinerger und muskarinergischer Rezeptoren durch Atropin überlagern und damit ein Teil der Atropinwirkung durch seine Bindung an nikotinerge Rezeptoren erklärbar sein.

Bei einem Teil der OFF-Antworten der LM zeigte die Atropinwirkung eine Abhängigkeit vom Stimulationsort. Dies ist schwer erklärbar, da die Stimulationselektroden parallel zum Verlauf der LM angeordnet sind. Geht man davon aus, dass cholinerge Muskelmotoneurone primär in orale Richtung projizieren, würde dies bedeuten, dass bei einer Stimulation entlang eines Longitudinalmuskelmesskanals weniger cholinerge Neurone aktiviert werden, je weiter der Stimulationsort in anale Richtung verschoben wird. Um diese Befunde an der LM allerdings weiter funktionell genauer zu identifizieren, wären Untersuchungen mit einer Anordnung der Stimulationselektroden wie an der ZM auch für die LM sinnvoll. Zudem könnten histologische Untersuchungen hinsichtlich der Projektion und Projektionslänge cholinergischer Neurone an die LM im porcinen Colon hier weiteren Aufschluss geben.

Bei unserer Studie wurden unter Atropin-Einfluss die EFS-Antworten, insbesondere die OFF-Kontraktionen, nicht komplett blockiert. Das zeigt, dass Acetylcholin ein wichtiger, aber nicht der einzige Transmitter bei der neural vermittelten Muskelkontraktion an den untersuchten Präparaten ist. Für die residuale exzitatorische EFS-Antwort könnten nichtcholinerge Komponenten wie Tachykine, zu denen u. a. Substanz P, Neurokinin A und Neuropeptid K gehören, denkbar sein (AMBACHE und FREEMAN 1968; MCCONALOGUE und FURNESS 1994). Dieser insgesamt geringe Atropin-Effekt auf die EFS-Antworten ist zunächst verwunderlich, da bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse zwischen Apparatur 1 und 2 kaum Atropin-sensitive EFS-Antworten gesehen wurden. Allerdings konnten in Apparatur 2 an einzelnen Messkanälen Atropin sensitive Reaktionen gemessen werden. Diese Atropin Sensitivität wurde auch in Untersuchungen, die am isolierten Ileum des Schweins (SCHMIDT und HOLST 1997), am Rattenmagen (BATISTA-LIMA et al. 2017, DEHPOUR et al. 1994) und am Colon von Menschen (MASELLI et al. 2011) und Kaninchen (SNAPE et al. 1989) durchgeführt wurden gesehen. Bei anästhesierten Ratten verminderte Atropin die propulsive Jejunum-Motilität stark und langanhaltend (BOGESKI et al. 2005). MÜNNICH (2009) stellte an isolierten Präparaten des Pansens von Schafen von Ziegen eine signifikante Reduktion der AUC (Area under the curve) der Kraftmesskurve über die Zeit nach EFS sowie der Kontraktionsamplitude durch Atropin fest. Am Meerschweinchenmagen blockierte Atropin die initiale (ON-) und zum Teil die späte (OFF-) Antwort, die durch EFS initiiert wurden (ROHN 2009).

Interessant ist, dass die Atropinwirkung bei einer eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  deutlicher war als bei höheren Konzentrationen. Auch hier könnte, wie schon bei der Betrachtung der Spontanmotilität unter Atropin-Einfluss (5.2.1.2.1.) diskutiert, vermutet werden, dass in höheren Konzentrationen, nikotinerge Rezeptoren an hemmenden cholinergen Interneuronen durch Atropin blockiert werden und diese dadurch die hemmende Wirkung von Atropin an den muskarinergischen Rezeptoren überlagern (KURZEN et al. 2007).

#### *5.2.2.2 Charakterisierung nitreger Einflüsse auf die EFS-Antworten mittels L-Name*

Die Applikation von L-NAME sollte dazu dienen, abzugrenzen, zu welchen Anteilen die Muskulatur direkt von nitregeren Mechanismen moduliert wird. Es war zu erwarten, dass es unter L-NAME Einfluss zu einer Steigerung der EFS-Antworten im Vergleich zur Kontrolle kommt, da die hemmenden Anteile der EFS-Antwort reduziert werden und die erregenden Anteile stärker hervortreten (BACCARI et al. 1997; BOECKXSTAENS et al. 1993). Von weiterem Interesse war, inwiefern L-NAME Einfluss auf die Ergebnisse in Abhängigkeit vom Stimulationsort nimmt.

#### *L-NAME-Sensitivität auf die EFS-Antworten an ZM und LM Vergleichend in Apparatur 1 und 2*

In der Gegenüberstellung der EFS-Antworten zwischen Apparatur 1 und 2 unter L-NAME Einfluss konnte insgesamt festgestellt werden, dass diese in der Mehrheit L-NAME sensitiv waren. Die ON- und OFF-Antworten der ZM an Apparatur 2 wurden signifikant erregend beeinflusst, das heißt, die Kontraktionen verstärkten sich nach L-NAME Applikation. L-NAME hatte auf die ON- wie auch auf die OFF-Antworten der ZM und LM an Apparatur 1 ebenfalls einen erregenden Einfluss, dieser war in 8 von 10 Fällen signifikant. Lediglich auf die ON- und auch OFF-Antworten der LM in Apparatur 2 hatte L-NAME entweder keine (Index nahe 1) oder in 4 von 8 Fällen eine signifikant hemmende Wirkung. Des Weiteren waren die erregenden L-NAME-Effekte an Apparatur 1 so stark ausgeprägt, dass diese sich im Median des Index in 8 von 12 Fällen signifikant von denen der Apparatur 2 unterschieden.

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit funktionellen Untersuchungen in ähnlichen Setups aus der Literatur, so konnte am Meerschweinchenmagen durch ROHN (2009) und an isolierten Präparaten des Pansens von Schafen und Ziegen durch MÜNNICH (2009) nach Zugabe von L-NAME eine meist signifikant erregend Nerv-Muskel-Antwort an ZM und LM nach EFS festgestellt werden. Unterschiede zwischen den beiden Muskelschichten fanden diese Autoren nicht. Da es sich hier allerdings um Magen bzw. Vormagen handelte, ist denkbar, dass die fehlenden Unterschiede zwischen den Muskelschichten Regionen- oder speziesspezifisch sind. Einen Hinweis auf eine Regionenspezifität liefern BARBIERS et al. (1993) sowie EKBLAD et al. (1994), die herausfanden, dass die ZM im Colon des Schweines und anderer Spezies besonders reich an NOS-positiven Fasern ist, während in der LM nur wenige davon nachgewiesen werden können.

#### *L-NAME-Sensitivität auf die EFS-Antworten an ZM und LM in Apparatur 2 in Abhängigkeit des Stimulationsortes*

In Apparatur 2 waren die EFS-Antworten der ZM am Ort der Stimulation unter L-NAME-Einfluss deutlich verstärkt (kontraktiler) (Abb. 42-49). Diese L-NAME Wirkung war konzentrationsabhängig. Die EFS-Antworten entfernt oder abseits vom Stimulationsort wurden hingegen kaum von L-NAME beeinflusst. Dieses Phänomen konnte sowohl für die ON- als auch OFF-Antworten beobachtet werden, wobei die L-NAME-Wirkung generell an den OFF-Antworten deutlicher sichtbar wurde. Die beobachteten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die EFS-Antworten nitreger Neurotransmission unterliegen. Weiterhin scheinen diese nitregeren Antworten insbesondere lokal um den Stimulationsort eine Rolle zu spielen. Diese Vermutung begründet sich darauf, dass die L-NAME Wirkung direkt am Stimulationsort am deutlichsten zutage trat. Die EFS-Antworten an den benachbarten Messbereichen unterschieden sich hingegen nicht, oder kaum von denen unter Kontrollbedingungen. Es ist daraus zu schließen, dass hemmende nitreger Motorneurone relativ kurze Projektionslängen haben, die innerhalb des lokalen Messbereichs des jeweiligen Kanals verbleiben.

Die vom Stimulationsort entfernten EFS-Antworten, die in den benachbarten Messbereichen aufgezeichnet werden konnten, unterschieden sich kaum von denen unter Kontrollbedingungen. Dies könnte darauf hinweisen, dass hemmende Antworten in diesen Bereichen über nicht-nitroge Interneurone oder lang projizierende hemmende Motoneurone vermittelt werden (SARNA 2010; BARBIERS et al. 1995; DOMOTO et al. 1990). Als beteiligte Transmitter kämen hier beispielsweise VIP, NPY oder PACAP in Frage (SANDERS et al. 2012). Die von uns ermittelten Befunde passen zu Angaben aus der Literatur, welche beschreiben, dass exzitatorische und inhibitorische Motoneurone im Dickdarm des Menschen im Mittel nur 2 mm proximal oder distal auf die ZM projizieren (PORTER et al. 1997). Auch Befunde am Meerschweinchenmagen weisen auf eine insbesondere lokale Wirkung nitroger Motorneurone hin. So konnte ROHN (2009) in seinen Untersuchungen am Magen des Meerschweinchens ebenfalls eine lokale Steigerung der ON- Antworten am zentralen Stimulationsort und aboral davon durch L-NAME feststellen.

#### *5.2.2.2.3 Charakterisierung nicotinerger Einflüsse auf die EFS-Antworten mittels Hexamethonium*

Die Applikation von Hexamethonium sollte dazu dienen, abzugrenzen, zu welchen Anteilen die Muskulatur indirekt über Interneurone moduliert wird, da diese untereinander und mit Motorneuronen größtenteils über nicotinerge Rezeptoren kommunizieren (WOOD 1994, SARNA 2010).

#### *Hexamethonium -Sensitivität auf die EFS-Antworten an ZM und LM vergleichend in Apparatur 1 und 2*

Insgesamt zeigten die EFS-Antworten in beiden Messapparaturen und für beide Muskulaturrichtungen eine, wenn auch nicht immer signifikante, dafür aber stets numerisch eindeutige Hexamethonium-Sensitivität auf. Die ON-Antworten der ZM und LM unterlagen in beiden Messapparaturen einem insgesamt hemmenden Einfluss durch Hexamethonium. Die OFF-Antworten in Apparatur 2 verringerten sich unter Hexamethonium-Einfluss ebenfalls. In Apparatur 1 wurden die OFF-Antworten der ZM und LM durch Hexamethonium allerdings gesteigert (Index >1). Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass die Hexamethonium-Sensitivität der EFS-Antworten in beiden Apparaturen auf eine Beteiligung cholinergischer Interneurone in der Vermittlung motorischer Antworten schließen lässt, die sich allerdings zwischen den beiden Setups unterscheidet. Diese Unterschiede weisen Parallelen zu den Befunden aus den Betrachtungen zur Spontanmotilität wie auch der EFS-Antworten unter Atropin-Einfluss auf. Hier wurden für hohe Atropin-Konzentrationen ebenfalls an Apparatur 1 eine erregende Wirkung insbesondere für die LM und teilweise für die ZM im Gegensatz zur hemmenden Wirkung in Apparatur 2 festgestellt. Als mögliche Begründung wurde die Anwesenheit nikotinerger ACh Rezeptoren auf hemmenden Motoneuronen diskutiert, die sowohl durch Hexamethonium als auch durch hohe Konzentrationen von Atropin blockiert werden können. Verschiedene Autoren (HARRINGTON et al. 2010; PARKER et al. 2003; AMBACHE 1955; BADER und DIENER 2015; KURZEN et al. 2007) haben festgestellt, dass Atropin in höheren Konzentrationen auch an nikotinerge Rezeptoren binden kann. Für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen in Apparatur 1 und 2 könnte die Größe der Gewebestücke in den Messapparaturen eine Rolle spielen. In den kleineren Gewebestücken in Apparatur 1 ist anzunehmen, dass weniger Interneurone vorhanden sind, bzw. diese, nur lokal projizierende Motorneurone innervieren. Eine generelle Beteiligung von Interneuronen auch im lokalen Bereich der Stimulation ist wahrscheinlich, da die OFF-Kontraktionen in Apparatur 1 an ZM und LM durch Hexamethonium signifikant gesteigert wurden und dieser Effekt mit steigender Hexamethonium-Konzentration zunahm. Somit muss vermutet werden, dass durch die Blockade der Nicotin-Rezeptoren entweder mehr erregende Motorneurone und / oder weniger hemmende Motorneurone angesteuert werden. ROHN (2009) konnte in seinen Untersuchungen am Meerschweinchenmagen ebenfalls EFS-

Antworten durch Hexamethonium blockieren. Die Wirkung von Hexamethonium war allerdings nur partiell mit der in dieser Arbeit vergleichbar. Hexamethonium hemmte am Meerschweinchenmagen die ortsabhängigen EFS-Antworten teilweise. Die ON-Antwort distal und proximal vom zentralen Stimulationsort wurde signifikant gehemmt, die OFF-Antworten beeinflusste es wiederum nicht.

#### *Hexamethonium-Sensitivität auf die EFS-Antworten an ZM und LM in Apparatur 2 in Abhängigkeit des Stimulationsortes*

Von weiterem Interesse war, inwiefern Hexamethonium Einfluss auf die EFS-Antworten in Abhängigkeit vom Stimulationsort nimmt. Hierbei war zu erwarten, dass die unter Kontrollbedingungen messbaren EFS-Antworten über den Stimulationsort hinaus, welche vermutlich durch Interneurone getragen werden, unterbleiben und primär lokale EFS-Antworten registriert werden können.

In unseren Untersuchungen war die Stärke der Hexamethonium-Wirkung jedoch nicht mit der Entfernung zum Stimulationsort korreliert. Vielmehr wirkte an Apparatur 2 Hexamethonium sowohl lokal am Stimulationsort als auch an den weiter entfernten Messbereichen hemmend. Diese Befunde weisen darauf hin, dass zum einen cholinerge Interneurone in die EFS-Antworten involviert sind und zum anderen ihre Wirkung auch schon lokal am Stimulationsort eine Rolle spielt.

Ein weiterer Befund war, dass die entfernt vom Stimulationsort registrierten Muskelantworten nur zum Teil Hexamethonium-sensitiv waren. Diese Hexamethonium resistenten EFS-Antworten könnten durch lang projizierende Muskelmotoneurone induziert worden sein. Diese Vermutung wird zum Teil durch Befunde aus Untersuchungen an humanem Colongewebe unterstützt. So beschreiben WATTCHOW et al. (1995), dass im menschlichen Dickdarm myenterische Motoneurone vom Dogiel Typ I ca. 16 mm lange Projektionen aufweisen. Allerdings haben Untersuchungen von Porter et al. (2002) beschrieben, dass beinahe alle zirkulären und longitudinalen Muskel-Motoneurone im menschlichen Dickdarm Projektionslängen von weniger als 10 mm haben.

Eine weitere mögliche Erklärung für die entfernt vom Stimulationsort registrierten Hexamethonium-resistenten Muskelantworten wäre die Beteiligung nicht-cholinерger Interneurone. Greift man auch hier wieder auf Befunde aus dem humanen Colon zurück, zeigt sich, dass Interneurone nicht immer einen cholinergen Phänotyp aufweisen. So exprimieren zwar 90 % der aufsteigenden Interneurone im humanen Colon ChAT, allerdings kann in 10 % der Somata keine ChAT nachgewiesen werden. Bei den absteigenden Interneuronen ist der nicht-cholinerge Anteil wesentlich höher (PORTER et al. 2002; SARNA 2010). So enthalten 49 % der absteigenden Interneurone nur nNOS, alle weiteren identifizierten Interneurone ChAT oder ChAT in Kombination mit nNOS und weiteren Neurotransmittern wie VIP (PORTER et al. 2002; SARNA 2010).

## 6 Zusammenfassung

Thomas Breuer

### **Evaluierung und Anwendung einer neuen Messmethode zur funktionellen Charakterisierung intrinsischer nervaler Schaltkreise am porcinen Colon**

Veterinär-Physiologisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Februar 2021

99 Seiten, 70 Abbildungen, 1 Tabelle, 253 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Messsystem, Evaluierung, enterisches Nervensystem, porcines Colon, cholinerg, nitroerg

Einleitung: Das kontrollierte Zusammenspiel zwischen glatter Muskulatur und enterischen Nervenzellen ist eine essentielle Voraussetzung für einen auf die Erfordernisse der Verdauungsprozesse angepassten Transport des Chymus im Magen-Darm-Kanal. Obwohl es zahlreiche Untersuchungen zu den einzelnen Komponenten dieses Zusammenspiels gibt, liegen nur wenige Erkenntnisse zur simultanen Steuerung der Zirkulär- (ZM) und Longitudinalmuskulatur (LM) durch nervale Komponenten vor. Aus meiner Diplomarbeit war für diesen Zweck ein neues Messsystem hervorgegangen, das simultane Motilitätsableitungen an den verschiedenen Muskelschichten im Darm ermöglicht.

Ziele der Untersuchungen: In der vorliegenden Arbeit sollte das neue Messsystem zur funktionellen Charakterisierung intrinsischer nervaler Schaltkreise insbesondere im Hinblick auf die Beteiligung cholinerg und nitroerger enterischer Nervenzellen am porcinen Colon angewendet und evaluiert und mit der bisher verfügbaren, eindimensionalen Messmethode verglichen werden.

Tiere, Material und Methoden: Die Untersuchungen erfolgten an Präparationen aus dem distalen Colon 21 adulter Schlachtschweine. Die Präparate bestanden aus ZM und LM und dem dazwischen liegenden myenterischen Plexus. Als Referenzmethode wurde die bisher standardmäßig eingesetzte eindimensionale Messmethode (Apparatur 1) angewendet. Diese beurteilte die Colonmotilität für ZM und LM getrennt voneinander, in je 2 Organbädern je Muskulaturrichtung, an Präparationen mit einer Größe von 1x3 cm. Mit dem neuen Messsystem (Apparatur 2) erfolgten simultane, zweidimensionale Motilitätsmessungen an je drei Messpunkten der ZM bzw. LM im Abstand von 2 cm innerhalb eines größeren Darmpräparates (5x5 cm). In beiden Messapparaturen wurden mittels elektrischer Feldstimulation (EFS) evozierte Nerv-Muskel-Antworten hervorgerufen. Diese EFS-Antworten setzten sich aus einer ON-Kontraktion (während der Stimulation) und einer OFF-Kontraktion (im unmittelbaren Anschluss an die Stimulation) zusammen. In Apparatur 2 erfolgte die EFS lokal an drei verschiedenen Positionen im Präparat. Es wurden in N=15 Versuchsansätzen vergleichende Untersuchungen zwischen Apparatur 1 und 2 zur Spontanmotilität sowie zu den nach EFS erzeugten Nerv-Muskel-Antworten gemacht. Um die Beteiligung intrinsischer cholinerg und nitroerger Komponenten in der Kontrolle der Darmmotilität zu untersuchen, wurden sowohl der Einfluss der cholinergen Antagonisten Atropin und Hexamethonium als auch eine Hemmung der NO- Synthese durch L-NAME (NG Nitro L arginine methylester Hydrochlorid) in je 3 Konzentrationsstufen und N=5 Versuchsansätzen je Hemmstoff erfasst. Für die statistische Analyse wurden nichtparametrischen Verfahren verwendet. Für Einstichprobentests wurde der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest genutzt und zur Testung nach Unterschieden innerhalb von Gruppen der Test nach Friedman und der Post-hoc Test nach Wilcoxon mit



angepasstem Signifikanzniveau für Mehrfachvergleiche nach Bonferroni. Paarweise Vergleiche erfolgten durch den Wilcoxon-Test. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bezeichnet, wenn das Signifikanzniveau ( $p$ )  $< 0,05$  war.

Ergebnisse: Apparatur 1 und 2 lieferten unter Kontrollbedingungen qualitativ gleichwertige Messergebnisse sowohl für die Spontanmotilität als auch für die EFS-Antworten an ZM und LM. Die Spontanmotilität wurde in beiden Messapparaturen durch die Hemmstoffe kaum beeinflusst. Zwischen den Messmethoden bestanden insbesondere an der LM teils signifikante Unterschiede in der Hemmstoffwirkung. Alle drei Hemmstoffe hatten an der LM in Apparatur 1 einen erregenden Einfluss auf die Spontanmotilität sowie die OFF-Antworten, während mit Apparatur 2 ein hemmender Einfluss festgestellt wurde.

Mit Apparatur 2 gelang es, lokal begrenzt im Abstand von 2 cm enterische Neurone durch EFS zu erregen und deren Muskel-Antworten am Ort der Stimulation wie auch an weiter entfernten Messorten oral und anal der Stimulationsstelle zu detektieren. Unter Kontrollbedingungen waren die OFF-Antworten der ZM signifikant vom Ort der Stimulation abhängig. Die OFF-Kontraktionen waren an anal zur Stimulationsstelle gelegenen Messpunkten signifikant niedriger ausgeprägt, während sie oral zum Stimulationsort signifikant stärker waren als am Stimulationsort selbst. Atropin und Hexamethonium führten an der ZM zu einer signifikanten Hemmung der OFF-Antworten, blockierten diese allerdings nicht komplett und waren unabhängig vom Ort der Stimulation. L-NAME demaskierte insbesondere direkt am Stimulationsort signifikant lokal erregende Anteile der EFS-Antworten.

Schlussfolgerungen: Die Spontanmotilität unterliegt im porcinen Colon, unabhängig von der Messmethode, kaum cholinergen und nitrergen Einflüssen. Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Messmethoden an der LM unter Hemmstoffeinfluss könnten Folge des Größenunterschiedes zwischen den Darmpräparaten sein und auf unterschiedliche Projektionslängen cholinerges wie auch nitrerges Neurone hinweisen. Acetylcholin ist zwar ein wichtiger, aber nicht der einzige Transmitter aus myenterischen Nervenzellen, der Muskelkontraktionen am porcinen Colon induziert. Nitrerge hemmende Motoneurone haben kurze Projektionslängen ( $< 2$  cm) und die entfernt vom Stimulationsort registrierten EFS-Antworten wurden eher durch nicht-nitrerge Interneurone oder nicht-nitrerge lang projizierende hemmende Motoneurone vermittelt. Cholinerge Interneurone sind an den EFS-Antworten beteiligt und spielen sowohl bei den lokalen als auch bei den weiter vom Stimulationsort entfernt registrierten EFS-Antworten eine Rolle.

Es ist mit dieser Arbeit gelungen, neue Erkenntnisse zu cholinergen und nitrergen enterischen Schaltkreisen am porcinen Colon zu gewinnen und eine neue Messmethode für zukünftige Untersuchungen zum Zusammenspiel von ZM und LM zu evaluieren und etablieren. Aufgrund der qualitativen Vergleichbarkeit der Messergebnisse zwischen beiden Messapparaturen kann in Folgeuntersuchungen mit Apparatur 2 auf bestehende Befunde aus eindimensionalen Untersuchungen zurückgegriffen werden. Vertiefend können durch die simultanen Motilitätsmessungen an ZM und LM sowohl Ausbreitungsrichtung als auch Zeitunterschiede zwischen den spontanen sowie evozierten Motilitätsmustern beider Muskelschichten bewertet werden.

## 7 Summary

Thomas Breuer

### **Evaluation and application of a new measurement method for the functional characterisation of intrinsic nervous circuits in the porcine colon**

Institute of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted February 2021

99 pages, 70 figures, 1 table, 253 references

Keywords: measurement system, evaluation, enteric nervous system, porcine colon, cholinergic, nitrergic

Introduction: The controlled interaction between smooth muscle and enteric nerve cells is an essential prerequisite for transporting chyme across the gastrointestinal tract adapted to the requirements of the digestive processes. Although there are numerous studies on the individual components of this interaction, there are only few findings on the simultaneous control of the circular (CM) and longitudinal muscles (LM) by nervous components. For this purpose, I developed a new measuring system, as part of my diploma thesis, to evaluate simultaneous motility of different muscle layers in the intestine.

Objective: In the present study, the new measurement system aimed to be applied and evaluated for the functional characterisation of intrinsic neural circuits, especially with regard to the involvement of cholinergic and nitrergic enteric neurons in the porcine colon, and compared with the previously available, one-dimensional measurement method.

Animals, materials and methods: The investigations were conducted on preparations from the distal colon of 21 adult slaughtered pigs. Preparations consisted of the CM and LM and the myenteric plexus in between. As a reference methodology in this study, apparatus 1 evaluated colonic motility for CM and LM separately, specifically in 2 organ baths per muscle directions on preparations with dimensions of 1x3 cm. With the new measuring system (apparatus 2), simultaneous, two-dimensional motility measurements were made at three measuring points each of the CM and LM at a distance of 2 cm within a larger intestinal preparation (5x5 cm). In both measuring apparatuses, evoked nerve-muscle responses were induced by applying electrical field stimulation (EFS). The EFS responses consisted of an ON contraction (during stimulation) and an OFF contraction (immediately after stimulation). In apparatus 2, the EFS occurred locally at three different positions in the preparation. Comparative analyses were made in N=15 experimental sets between apparatus 1 and 2 on spontaneous motility and on nerve-muscle responses induced by EFS. In order to investigate the involvement of intrinsic cholinergic and nitrergic components in the control of intestinal motility, the influence of the cholinergic antagonists atropine and hexamethonium as well as an inhibition of NO synthesis by L-NAME (NG Nitro L arginine methylester Hydrochlorid) was recorded in 3 concentration levels and N=5 test sets per inhibitor. For the statistical analysis, non-parametric procedures were used. For single sample tests, the Wilcoxon signed-rank test was used and to test for differences within groups, the Friedman test and the Wilcoxon post-hoc test with adjusted significance level for multiple comparisons according to Bonferroni. Pairwise comparisons were done by the Wilcoxon test. Results were termed statistically significant if the significance level (p) was < 0.05.

Results: Under control conditions, apparatus 2 produced qualitatively equivalent measurement results to Apparatus 1 both for spontaneous motility and for the EFS responses at CM and LM. Spontaneous motility was hardly influenced by the inhibitors in both measurement apparatuses. However, there were partly significant differences in the inhibitor effect between the measurement methods at the LM. All inhibitors had an excitatory influence on spontaneous motility and OFF responses at the LM in apparatus 1, in contrast to an inhibitory effect with apparatus 2.

Using apparatus 2, it was possible to stimulate locally limited enteric neurons at a distance of 2 cm by EFS and to detect their evoked muscle responses at the site of stimulation as well as at more distant measurement positions orally and anally of the stimulation site. Under control conditions, the EFS responses of the CMs were significantly depending on the location of site of stimulation. In particular, OFF contractions were significantly lower at sites anal to the stimulation site, whereas they were significantly stronger orally to the stimulation site than at the stimulation site itself. Atropine and hexamethonium significantly inhibited the EFS responses at the CM regardless of the site of stimulation, but did not block them completely. In particular, L-NAME uncovered significantly local excitatory components of the EFS responses directly at the site of stimulation.

Conclusions: Spontaneous motility in the porcine colon is hardly subject to cholinergic and nitrergic influences, regardless of the measurement method. Differences in the results between the measurement methods on the LM under inhibitor influence could be a consequence of the size variation between the intestinal preparations and indicate different projection lengths of cholinergic as well as nitrergic neurons. Acetylcholine is an important but not the only transmitter from myenteric neurons that induces muscle contractions at the porcine colon. Nitrergic inhibitory motor neurons have short projection lengths (< 2 cm) and the EFS responses recorded far from the stimulation site were more likely to be mediated by non-nitrergic interneurons or non-nitrergic long-projecting inhibitory motor neurons. Cholinergic interneurons are involved in the EFS responses and play a role in EFS responses that are near and distant from the stimulation site.

From this study, we gained insight into cholinergic and nitrergic enteric circuits in porcine colon. Moreover, we also established an efficient method for evaluating the interaction between CM and LM, which could prove useful to future studies. Due to the qualitative comparability of the measurement results between the two measurement apparatuses, existing findings from one-dimensional investigations can be used in follow-up investigations with apparatus 2. Simultaneous motility measurements on the CM and LM can be used to examine closely the direction of propagation and time differences between the spontaneous and evoked motility patterns of both muscle layers

## 8 Literaturverzeichnis

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593–615.
- Alvarez WC. Conduction in the small intestine. *Am J Physiol.* 1919;26:99–143.
- Alvarez WC. *An Introduction to Gastroenterology.* 4. Aufl. New York: Hoeber; 1948.
- Ambache N. The use and limitations of atropine for pharmacological studies on autonomic effectors. *Pharmacol Rev.* 1955;7(4):467–94.
- Ambache N, Freeman MA. Atropine-resistant longitudinal muscle spasms due to excitation of non-cholinergic neurones in Auerbach's plexus. *J Physiol.* 1968;199(3):705–27.
- Auerbach L, Über einen Plexus gangliosis myogastricus. 39er Jahr-Bericht und Abhandlung d. Schlesischen Gesellschaft f. Vaterländ. Cult. 1862; S.103-4.
- Bader S, Diener M. Novel aspects of cholinergic regulation of colonic ion transport. *Pharmacol Res Perspect.* 2015;3(3),e00139.
- Bär F, von Koschitzky H, Roblick U, Bruch HP, Schulze L, Sonnenborn U. et al. Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21(5):559-66.
- Barbiers M, Timmermans JP, Adriansen D, De Groodt-Lasseel MH, Scheuermann DW. Projections of neurochemically specified neurons in the porcine colon. *Histochem Cell Biol.* 1995;103(2):115-26.
- Barbiers M, Timmermans JP, Scheuermann DW, Adriansen D, Mayer B, De Groodt-Laasseel MH. Distribution and morphological features of nitrergic neurons in the porcine large intestine. *Histochemistry.* 1993;100(1):27-34.
- Barnes KJ, Beckett EA, Brookes SJ, Sia TC, Spencer NJ. Control of intrinsic pacemaker frequency and velocity of colonic migrating motor complexes in mouse. *Front Neurosci.* 2014;8:96.
- Bassotti G und Gaburri M. Manometric investigation of high-amplitude propagated contractile activity of the human colon. *Am J Physiol.* 1988;255:G660-4.
- Bassotti G, de Roberto G, Chistolini F, Sietchiping-Nzepa F, Morelli O, Morelli A. Twenty-four-hour manometric study of colonic propulsive activity in patients with diarrhea due to inflammatory (ulcerative colitis) and non-inflammatory (irritable bowel syndrome) conditions. *Int J Colorectal Dis.* 2004;19(5): 493-7.
- Batista-Lima FJ, Gadelha KKL, Oliveira DM, Vasconcelos TB, Brito TS, Magalhães PJC. A simple laboratory exercise with rat isolated esophagus and stomach fundus to reveal functional differences between striated and smooth muscle cells. *Adv Physiol Educ.* 2017;41(2),291–7.
- Bazzocchi G, Ellis J, Villanueva-Meyer J, Jing J, Reddy SN, Mena I, Snapa WJ Jr. Postprandial colonic transit and motor activity in chronic constipation. *Gastroenterology.* 1990;98(3): 686-93.
- Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol.* 1899; 24(2):99–143.

Beck K, Friebe A, Voussen B. Nitrergic signaling via interstitial cells of Cajal and smooth muscle cells influences circular smooth muscle contractility in murine colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2018;30 (6), e13300.

Bedrich M und Ehrlein H. Motor function of the large intestine and flow of digesta in sheep. *Small Ruminant Res.* 2001;42: 141-55.

Beglinger C. What is motility all about? *Ther Umsch.* 2007;64(4), 191–3.

Benabdallah H, Messaoudi D, Gharzouli K. The spontaneous mechanical activity of the circular smooth muscle of the rabbit colon in vitro. *Pharmacol Res.* 2008;57(2):132–41.

Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature.* 1994;368 (6471): 502.

Bian X-C, Heffer LF, Gwynne RM, Bornstein JC, Bertrand PP. Synaptic transmission in simple motility reflex pathways excited by distension in guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(5):G1017-27.

Blair PJ, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells in the primate gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 2012;350(2):199-213.

Boeckxstans G, Camilleri M, Sifrim D, Houghton LA, Elsenbruch S, Lindberg G, Aspiroz F, Parkman HP. Fundamentals of Neurogastroenterology: Physiology/Motility - Sensation. *Gastroenterology.* 2016;150: 1292-304.

Bogeski G, Shafton AD, Kitchener PD, Ferens DM, Furness JB. A quantitative approach to recording peristaltic activity from segments of rat small intestine in vivo. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17(2),262–72.

Bornstein JC, Costa M, Grider JR. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16(Suppl.1):34-8.

Brierley SM, Nichols K, Grasby DJ, Waterman SA. Neural mechanisms underlying migrating motor complex formation in mouse isolated colon. *Br J Pharmacol.* 2001;132: 507-17.

Broad J, Hughes F, Chin-Aleong J, Sifrim D, Sanger GJ. Regionally dependent neuromuscular functions of motilin and 5-HT(4) receptors in human isolated esophageal body and gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(9),1311–22.

Brookes SJ, Ewart WR, Wingate DL. Intracellular recordings from myenteric neurones in the human colon. *J Physiol.* 1987;390,305–18.

Brookes SJ. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec.* 2001;262(1),58–70.

Brown DR und Timmermans JP. Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16(1):50-4.

Buckley N und Burnstock G. Autoradiographic localisation of muscarinic receptors in guinea-pig intestine: distribution of high and low affinity agonist binding sites. *Brain Res.* 1984;294(1):15–22.

Buckley NJ und Burnstock G. Localization of muscarinic receptors on cultured myenteric neurons: a combined autoradiographic and immunocytochemical approach. *J Neurosci.* 1986;6(2):531–40.

Burleigh DE und Furness JB. Distribution and actions of galanin and vasoactive intestinal peptide in the human colon. *Neuropeptides*. 1990;16(2),77–82.

Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):12008-13.

Burnstock G. The effect of drugs on spontaneous motility and on response to stimulation of the extrinsic nerves of the gut of a teleostean fish. *Brit J Pharmacol*. 1958;13:216-26.

Cajal SR. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: Maloine. 1911;2:891-942.

Carbone SE, Dinning PG, Costa M, Spencer NJ, Brookes SJH, Wattchow DA. Ascending excitatory neural pathways modulate slow phasic myogenic contractions in the isolated human colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25(8),670–6.

Chen JH, Zhang Q, Yu Y, Li K, Liao H, Jiang L, Hong L, Du X, Hu X, Chen S, Yin S, Gao Q, Yin X, Luo H, Huizinga JD. Neurogenic and myogenic properties of pan-colonic motor patterns and their spatiotemporal organization in rats. *PLoS*. 2013;8(4):e60474.

Chey WJ, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(5):1499-1506.

Clemens CH, Samsom M, Roelofs JM, van Berge Henegouwen GP, Smout AJ. Association between pain episodes and high amplitude propagated pressure waves in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(8):1838-43.

Cook IJ, Brookes SJ, Waterman S, Mayo R. Relationships between spatial patterns of colonic pressure and individual movements of content. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278(2):G329-41.

Costa M, Brookes SJ, Waterman S, Mayo R. Enteric neuronal circuitry and transmitters controlling intestinal motor function. In: Holle GE, Wood JD Hrsg. *Advances in the innervation of the gastrointestinal tract*. 1. Aufl. München:1992,115-24.

Costa M und Furness JB. The peristaltic reflex: an analysis of the nerve pathways and their pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1976;294(1): 47-60.

Costa M, Dodds KN, Wiklendt L, Spencer NJ, Brookes SJ, Dinning PG. Neurogenic and myogenic motor activity in the colon of the guinea-pig, mouse, rabbit and rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;305:G749-59.

Costa M, Wiklendt L, Simpson P, Spencer NJ, Brookes SJ, Dinning PG. Neuromechanical factors involved in the formation and propulsion of fecal pellets in the guinea-pig colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2015;27:1466-77.

Cornelissen W, De Laet A, Kroese AB, van Bogaert PP, Scheuermann DW, Timmermans JP. Excitatory synaptic inputs on myenteric Dogiel type II neurones of the pig ileum. *J Comp Neurol*. 2001;432(2),137–54.

Crowell MD, Musial F, French W, Kittur D, Anderson D, Whitehead WE. Prolonged ambulatory monitoring of colonic motor activity in the pig. *Physiol Behav*. 1992;52, 471-4.

D'Antona G, Hennig GW, Costa M, Humphreys CM, Brookes SJ. Analysis of motor patterns in the isolated guinea-pig large intestine by spatio-temporal maps. *Neurogastroenterol Motil*. 2001;13:483-92.

De Schryver AM, Samsom M, Smout AJ. In search of objective manometric criteria for colonic high-amplitude propagated pressure waves. *Neurogastroenterol Motil.* 2002;14:375-81.

Degen L. Gastrointestinale Motilität - Physiologie und Messmethoden. *Ther Umsch.* 2007;64:195-9.

Dehpour AR, Delfan A, Mousavizadeh K, Mortazavi SR. Effects of atropine, pirenzepine, clonidine, and morphine on biphasic response of rat gastric fundus to field stimulation. *Gen Pharmacol.* 1994;25(5):951-5.

Denac M, Oertle C, Kümin G, Eggenberger E, Scharrer E. Relaxation of muscle strips from the reticular groove and reticulo-omasal orifice by vasoactive intestinal peptide (VIP). *Zentralbl Veterinarmed A.* 1990;37:425-9.

DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen X-T, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C. A G protein-biased ligand at the  $\mu$ -opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;344(3):708-17.

Dietrich C, Kilbinger H. Prejunctional M1 and postjunctional M3 muscarinic receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995;351(3):237-43.

Dinning PG, Costa M, Brookes SJ, Spencer NJ. Neurogenic and myogenic motor patterns of rabbit proximal, mid and distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303:G83-92.

Dinning PG, Wiklendt L, Maslen L, Gibbins I, Patton V, Arkwright JW, Lubowski DZ, O'Grady G, Bampton PA, Brookes SJ, Costa M. Quantification of in vivo colonic motor patterns in healthy humans before and after a meal revealed by high-resolution fiberoptic manometry. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(10):1443-57.

Dogiel AS. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. *Arch. Anat. Physiol. Leipzig, Anat.Abt.* 1899;130-158.

Domoto T, Bishop AE, Oki M, Polak JM. An in vitro study of the projections of enteric vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the human colon. *Gastroenterology* 1990;98(4):819-27.

Donnelly G, Jackson TD, Ambrous K, Ye J, Safdar A, Faraway L, Huizinga JD. The myogenic component in distention-induced peristalsis in the guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280(3):G491-500.

Ehrlein HJ, Reich H, Schwinger M. Physiological significance of the contractions of the rabbit proximal colon. *Q J Exp Physiol.* 1982;67:407-17.

Ekblad E, Alm P, Sundler F. Distribution, origin and projections of nitric oxide synthase-containing neurons in gut and pancreas. *Neuroscience.* 1994;63(1):233-48.

von Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G. *Physiologie der Haustiere.* 4. Aufl. Stuttgart: Enke;2015.

Farzi A, Halicka J, Mayerhofer R, Fröhlich EE, Tatzl E, Holzer P. Toll-like receptor 4 contributes to the inhibitory effect of morphine on colonic motility in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2015;26(5):9499.

Fida R, Lyster DJ, Bywater RA, Taylor GS. Colonic migrating motor complexes (CMMCs) in the isolated mouse colon. *Neurogastroenterol Motil.* 1997;9:99-107.

Ford MJ, Camilleri M, Wiste JA, Hanson RB. Differences in colonic tone and phasic response to a meal in the transverse and sigmoid human colon. *Gut.* 1995;37:264-9.

Frantzides CT, Sarna SK, Matsumoto T, Lang IM, Condon RE. An intrinsic neural pathway for long intestine-intestinal inhibitory reflexes. *Gastroenterology*. 1987;92:594-603.

Fujimoto H, Shigemasa Y, Suzuki H. Properties of spontaneous contractions and their modulation by transmural nerve stimulation in circular smooth muscle isolated from the pacemaker area in the flexure region of the guinea-pig colon. *J Smooth Muscle Res*. 2010;46:293-308.

Fukui H, Xu X, Miwa H. Role of Gut Microbiota-Gut Hormone Axis in the Pathophysiology of Functional Gastrointestinal Disorders. *J Neurogastroenterol Motil*. 2018; 24(3):367-86.

Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer;2020.

Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 2000;81: 87-96.

Furness JB, Bornstein JC, Kunze WA, Bertrand PP, Kelly H, Thomas EA. Experimental basis for realistic large-scale computer simulation of the enteric nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23(9):786-92.

Furness JB, Clerc N, Lomax AE, Bornstein JC, Kunze WA. Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res*. 2000;300(3):786-92.

Frey H und Löscher W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3. Aufl. Stuttgart: Enke;2009.

Gäbel G, Garz B, Ahrens F, Aschenbach JR. Effect of nitric oxide on electrolyte transport across the porcine proximal colon. *J Comp Physiol B*. 2003;173(3),177–86.

Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*. 1987;22(2):737-52.

Gallego D, Hernández P, Clavé P, Jiménez M. P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:G584-94.

Gallego D, Malagelada C, Accarin A, De Giorgio R, Malagelada JR, Azpiroz F, Jimenez M. Nitrergic and purinergic mechanisms evoke inhibitory neuromuscular transmission in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil*. 2014;26:419-29.

Gallego D, Mané N, Gil V, Martinez-Cutillas M, Jiménez M. Mechanism responsible for neuromuscular relaxation in the gastrointestinal tract. *Rev Esp Enferm Dig*. 2016;108:721-31.

Galligan JJ. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*. 2002;14(6):611–23.

Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20Suppl7:3–14.

Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013;20(1):14-21.

Gershon MD und Tack J. The serotonin signalling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414.



- Gonzalez A, Sarna SK. Neural regulation of in vitro giant contractions in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001(a);281:G275–82.
- Gonzalez A, Sarna SK. Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001(b);280:G546–54.
- Graham AM, Sneddon P. Evidence for nitric oxide as an inhibitory neurotransmitter in rabbit isolated anococcygeus. In: *European Journal of Pharmacology*. 1993;237(1):93–99.
- Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006;22(2):102–10.
- Grider JR und Makhoul GM. Colonic peristaltic reflex: identification of vasoactive intestinal peptide as mediator of descending relaxation. *Am J Physiol*. 1986;251:G40–5.
- Grider JR. Identification of neurotransmitters regulating intestinal peristaltic reflex in humans. *Gastroenterology*. 1989;97(6):1414–9.
- Grider JR. Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. *Am J Physiol*. 1993;264:G334–40.
- Grider JR, Kuemmerle JF, Jin JG. 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT<sub>4</sub>/5-HT<sub>1p</sub> receptors on sensory CGRP neurons. *Am J Physiol*. 1996;270:G778–82.
- Grider JR. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(2):460–7.
- Grider JR. Gastrin-releasing peptide is a modulatory neurotransmitter of the descending phase of the peristaltic reflex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(6):G1109–15.
- Grider JR und Jin JG. Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation. *J Neurosci*. 1994;14(5):2854–60.
- Hafemann DR. Binding of radioactive tetrodotoxin to nerve membrane preparations. *Biochimica et biophysica acta*. 1972;266(2):548–56.
- Hansen MB. The enteric nervous system I: Organisation and classification. *Pharmacol Toxicol*. 2003;92:105–13.
- Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytochem*. 2010;44(4):173–202.
- He C, Li H, Zhang J, Zhou L, Dong S. In vitro and in vivo characterization of the bifunctional  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors ligand MCRT on mouse gastrointestinal motility. *Neuropeptides*. 2019; 74:82–7.
- Hens J, Schrödl F, Brehmer A, Adriaensen D, Neuhuber W, Scheuermann DW, Schemann M, Timmermans JP. Mucosal Projections of Enteric Neurons in the Porcine Small Intestine. *J Comp Neurol*. 2000;421:429–36.
- Heredia DJ, Gershon MD, Koh SD, Corrigan RD, Okamoto T, Smith TK. Important role of mucosal serotonin in colonic propulsion and peristaltic reflexes: in vitro analyses in mice lacking tryptophan hydroxylase 1. *J Physiol*. 2013;591(23):5939–57.
- Hibberd TJ, Costa M, Travis L, Brookes SJH, Wattchow DA, Feng J, Hu H, Spencer NJ. Neurogenic and myogenic patterns of electrical activity in isolated intact mouse colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2017;29(10):1–12.

- Hipper K, Ehrlein HJ. Motility of the large intestine and flow digesta in pigs. *Res Vet Sci*. 2001;71(2): 93-100.
- Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007;87:1409-39.
- Holst MC, Kelly JB, Powley TL. Vagal preganglionic projections to the enteric nervous system characterized with Phaseolous vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 1997;381:81-100.
- Hoyle CH, Burnstock G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *Journal of anatomy*. 1989;166:7-22.
- Huizinga JD und Lammers WJEP. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296:G1-G8.
- Huizinga JD, Diamant NE, El-Sharkawy TY. Electrical basis of contractions in the muscle layers of the pig colon. In: *The American journal of physiology*. 1983;245(4):G482-91.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Natur*. 1995;373: 347-9.
- Huizinga JD, Martz S, Gill V, Wang XY, Jimenez M, Parsons S. Two independent networks of interstitial cells of Cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. *Front Neurosci*. 2011;5:93.
- Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*. 2014;509(7500):310-7.
- Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience*. 2008;152: 437-438.
- Jeong EJ, Chung SY, Hong HN, Oh SW, Sim JY. The novel, potent and highly selective 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist YH12852 significantly improves both upper and lower gastrointestinal motility. *Br J Pharmacol*. 2018;175(3):485-500.
- Jin JG, Foxx-Orenstein AE, Grider JR. Propulsion in guinea pig colon induced by 5-hydroxytryptamine (HT) via 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(1):93-7.
- Kadowaki M, Wade PR, Gershon MD. Participation of 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, and nicotinic receptors in the peristaltic reflex of guinea pig distal colon. *Am J Physiol*. 1996;271:G849-57.
- Kalantar-Zadeh K, Ha N, Ou JZ, Berean KJ. Ingestible sensors. *ACS Sens*. 2017;2(4):468-83.
- Karaus M und Sarna SK. Giant migrating contractions during defecation in the dog colon. *Gastroenterology*. 1987;92:925-33.
- Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, Larauche M, Duboc H, Earle KA et al. Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology*. 2013;144(5):967-77.
- Kendig DM und Grider JR. Serotonin and colonic motility. *Neurogastroenterol Motil*. 2015;27(7):899-905.
- Kilbinger H und Wagner P. Inhibition by oxotremorine of acetylcholine resting release from guinea pig-ileum longitudinal muscle strips. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1975;287(1):47-60.
- Kilbinger H und Wessler I. Pre- and postsynaptic effects of muscarinic agonists in the guinea-pig ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1980;314(3):259-66.

Klein S, Seidler B, Kettenberger A, Sibaev A, Rohn M, Feil R, Allescher HD, Vanderwinden JM, Hofmann F, Schemann M, Rad R, Storr MA, Schmid RM, Schneider G, Saur D. Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with intestinal slow-wave activity. *Nat Commun.* 2013;4: 1630.

Köhn E. Dünn- und Dickdarmmotilität des Pferdes [Dissertation med.vet.]. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover;2000.

Kugler EM, Michel K, Zeller F, Demit IE, Ceyhan GO, Schemann M, Mazzuoli-Weber G. Mechanical stress activates neurites and somata of myenteric neurons. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:342.

Kugler EM, Michel K, Kirchenbühler D, Dreissen G, Csiszár a, Merkel R, Schemann M, Mazzuoli-Weber G. Sensitivity to strain and shear stress of isolated mechanosensitive enteric neurons. *Neuroscience.* 2018;372:213-24.

Kunze WA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:117-42.

Kuriyama H, Osa T, Toida N. Nervous factors influencing the membrane activity of intestinal smooth muscle. *J Physiol.* 1967;191(2):257–70.

Kuriyama H, Osa T, Toida N. Electrophysiological study of the intestinal smooth muscle of the guinea-pig. *J Physiol.* 1967;191(2):239–55.

Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res.* 2007;39(2):125–35.

Langley JN. The autonomic nervous system. Cambridge: W. Heffer;1921.

Langley JN und Anderson HK. The innervation of the pelvic and adjoining viscera. IV. The internal generative organs. *J Physiol.* 1895;19:122-30.

Langton P, Ward SM, Carl A, Norell AM, Sanders KM. Spontaneous electrical activity of interstitial cells of Cajal isolated from canine proximal colon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:7280-4.

Le Sciellour M, Labussière E, Zemb O, Renaudeau D. Einfluss des Ballaststoffgehalts auf die Nährstoffverdaulichkeit und die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota bei Zuchtschweinen. *PLoS One.* 2018;13(10):e0206159.

Lecci A, Santicioli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol.* 2002;2:630-41

Lefebvre RA, Callens C, van Colen I, Delesalle CJG. The 5-HT4 receptor agonist prucalopride does not facilitate cholinergic neurotransmission in circular and longitudinal smooth muscle preparations of equine mid-jejunum. *Res Vet Sci.* 2017;114:153–62.

Lentle RG, Janssen PW, Asvarujanon P, Chambers P, Stafford KJ, Hemar Y. High-definition spatiotemporal mapping of contractile activity in the isolated proximal colon of the rabbit. *J Comp Physiol B.* 2008;178:257-68.

Liebich H-G. Organe, Kreislauf- und Nervensystem. In: König HE Hrsg. *Anatomie der Haussäugetiere.* 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2002.

Lies B, Gil V, Groneberg D, Seidler B, Saur D, Wischmeyer E, Jiménez M, Friebe A. Interstitial cells of Cajal mediate nitrergic inhibitory neurotransmission in the murine gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307:G98-106.

Lin AY, Du P, Dinning PG, Arkwright JW, Kamp JP, Cheng LK, Bissett IP, O'Grady G. High-resolution anatomic correlation of cyclic motor patterns in the human colon: Evidence of a rectosigmoid brake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017;312(5):G508-15.

Linden DR, Levitt MD, Farrugia G, Szurszewski JH. Endogenous production of H<sub>2</sub>S in the gastrointestinal tract: Still in search of a physiologic function. *Anti-oxid Redox Signal*. 2010;12:1135-46.

Lomax AE, Sharkey KA, Bertrand PP, Low AM, Bornstein JC, Furness JB. Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon. *J Auton Nerv Syst*. 1999;76(1):45-61.

Lomax AE und Furness JB. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res*. 2000;302(1):59–72.

Lomax AE, O'Hara JR, Hyland NP, Mawe GM, Sharkey KA. Persistent alterations to enteric neural signalling in the guinea pig colon following the resolution of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G482-91.

Lyster DJ, Bywater RA, Taylor GS. Neurogenic control of myoelectric complexes in the mouse isolated colon. *Gastroenterology*. 1995;108:1371-8.

Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Effects of GLP-1 and incretin-based therapies on gastrointestinal motor function. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:279530.

Martins P, Fakhry J, Chaves de Oliveira E, Hunne B, Fothergill LJ, Ringuet M, d'Avila Reis D, Rehfeld JF, Callaghan B, Furness JB. Analysis of enteroendocrine cell populations in the human colon. *Cell Tissue Res*. 2017;367:161-8.

Maselli MA, Trisolini P, Demma I, Pezzolla F, Ponti F. Gender- and age-related differences in muscular and nerve-mediated responses in human colon. *Digestive diseases and sciences*. 2011;56(2):352–8.

Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276:905-8.

Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, Taketo MM, Makoto M. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci*. 2002;22(24):10627–32.

Mawe GM und Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(8):473–86.

Mazzuoli G und Schemann M. Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J Physiol*. 2009;587:4681-94.

Mazzuoli G und Schemann M. Mechanosensitive enteric neurons in the myenteric plexus of the mouse intestine. *PLoS One*. 2012;7(7):e39887.

- Mazzuoli-Weber G und Schemann M. Mechanosensitivity in the enteric nervous system. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:408.
- McConalogue K und Furness JB. Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1994;8(1):51–76.
- McRorie J, Greenwood-van Meerveld B, Rudolph C. Characterization of propagating contractions in proximal colon of ambulatory mini pigs. *Dig Dis Sci.* 1998;43:957-63.
- Messenger JP, Furness JB, Trudrung P. Locations of postganglionic nerve cells whose axons enter nerves originating from prevertebral ganglia. *Arch Histol Cytol.* 1994;57:405-13.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42.
- Moncada S und Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.
- Moore PK und Handy RL. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase--is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(6):204–11.
- Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, et al. Ghrelin. *Mol Metab.* 2015;4:437-60.
- Münnich J. Intrinsische Innervation im Pansen von Wiederkäuern verschiedener Ernährungstypen. [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Universität Leipzig;2009.
- Murphy KG und Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature.* 2006;444:854-9.
- Neimeier K. Röntgenologische Beobachtungen am Magendarm-Kanal des Schweines. [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule;1939.
- Nichols K, Staines W, Krantis A. Neural sites of the human colon colocalize nitric oxide synthase-related NADPH diaphorase activity and neuropeptide Y. *Gastroenterology.* 1994;107(4):968–75.
- Neunlist M; Dobрева G; Schemann M. Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J Physiol.* 1999;517:533–46.
- Nurgali K; Furness JB, Stebbing MJ. Correlation of electrophysiology, shape and synaptic properties of myenteric AH neurons of the guinea pig distal colon. *Auton Neurosci.* 2003;103:50–64.
- Ohashi Y, Inoue R, Tanaka K, Umesaki Y, Ushida K. (2001): Strain gauge force transducer and its application in a pig model to evaluate the effect of probiotic on colonic motility. *J Nutri Sci Vitaminol.* 2001;47(5):351–6.
- Okamoto T, Barton MJ, Hennig GW, Birch GC, Grainger N, Corrigan RD, Koh SD, Sanders KM, Smith TK. Extensive projections of myenteric serotonergic neurons suggest they comprise the central processing unit in the colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26:556-70.
- Olsson C und Holmgren S. The control of gut motility. Review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;128:481-503.
- Otterson MF und Sarna SK. Neural control of small intestinal giant migrating contractions. *Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol* 1994;266:G576-84.

- Otto T. Entwicklung eines in-vitro-Systems zur funktionellen Charakterisierung enterischer Schaltkreise am porcinen Colon. Diplomarbeit. Jena: Fachhochschule Jena; 2006.
- Pan H und Gershon MD. Activation of Intrinsic Afferent Pathways in Submucosal Ganglia of the Guinea Pig Small Intestine. *J. Neurosci.* 2000;20(9):3295–3309.
- Palmer JM, Schemann M, Tamura K, Wood JD, Jackie D. Calcitonin gene-related peptide excites myenteric neurons. *Eur J Pharmacol.* 1986;132:163–70.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333(6174):664–6.
- Parker JC, Sarkar D, Quick MW, Lester RAJ. Interactions of atropine with heterologously expressed and native  $\alpha 3$  subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol.* 2003;138(5):801–10.
- Peeters TL. Gastrointestinal hormones and gut motility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22:9-13.
- Petto C, Gäbel G, Pfannkuche H. Architecture and Chemical Coding of the Inner and Outer Submucous Plexus in the Colon of Piglets. *PloS One.* 2015;10(7),e0133350.
- Pfannkuche H. Intrinsische Steuerung vom Vormagen und vom einhöhligen Magen: Charakterisierung spezialisierter Innervationsmuster. [Habilschr.med.vet.], Leipzig: Univ. Leipzig;2004.
- Pfannkuche H, Mauksch A, Gäbel G. Modulation of electrogenic transport processes in the porcine proximal colon by enteric neurotransmitters. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2012;96(3):482–93.
- Pfannkuche H und Schemann M. Enterisches Nervensystem und die Innervation des Magen-Darm-Traktes. In: von Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere.* 5. Aufl. Enke Verlag, Deutschland;2015. S.351–361.
- Piquet JM, Whittle BJR und Esplugues JV. The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculations. *Eur J Pharmacol.* 1989;174:293-6.
- Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281:G255-66.
- Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology.* 1997;113(6):1916-23.
- Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJH, Costa M. Cholinergic and nitrergic interneurons in the myenteric plexus of the human colon. *Gut.* 2002;51(1):70–75.
- Powell AK und Bywater RA. Endogenous nitric oxide release modulates the direction and frequency of colonic migrating motor complexes in the isolated mouse colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2001;13:221-8.
- Rae MG, Fleming N, McGregor DB, Sanders KM, Keef KD. Control of motility patterns in the human colonic circular muscle layer by pacemaker activity. *J Physiol.* 1998;510:309–20.
- Rao SS, Sadeghi P, Beaty J, Kavlock R, Ackerson K. Ambulatory 24-h colonic manometry in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280:G629-39.
- Roberts RR, Bornstein JC, Bergner AJ, Young HM (2008): Disturbances of colonic motility in mouse models of Hirschsprung's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294:G996-1008.

- Roden S. An experimental study on intestinal movements; particularly with regard to ileus conditions in cases of trauma and peritonitis. *Acta Chir Scand.* 1937;80:1–146.
- Rohn M. In vitro-Reflexe am isolierten Magen [Dissertation rer.nat.]. München: TU München; 2009.
- Ruckebusch Y und Fioramonti J. Colonic myoelectrical spiking activity: major patterns and significance in six different species. *Zentralbl Veterinar A.* 1980;27:1-8.
- Rumessen JJ, Vanderwinden JM, Hansen A, Horn T. Ultrastructure of interstitial cells in subserosa of human colon. *Cells Tissues Organs* 2013;197(4):322-32.
- Sabourin PJ, Kingma YJ, Bowes KL. Electrical and mechanical interactions between the muscle layers of canine proximal colon. *Am J Physiol.* 1990;258:G484-91.
- Salomon F-V, Geyer H, Gille U. Anatomie für die Tiermedizin. 4.Aufl. Stuttgart, New York, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2020.
- Sanders KM, Stevens R, Burke E, Ward SW. Slow waves actively propagate at submucosal surface of circular layer in canine colon. *Am J Physiol.* 1990;259:G258-63.
- Sanders KM, Ordog T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil.* 1999;11:311-38.
- Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:307-43.
- Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility – insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9:633-45.
- Sanders KM, Kito Y, Hwang SJ, Ward SM. Regulation of gastrointestinal smooth muscle function by interstitial cells. *Physiology.* 2016;31:316-26.
- Sanger GJ und Lee K. Hormones of the gut-brain axis as targets for the treatment of upper gastrointestinal disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:241-54.
- Sarna S; Stoddard C, Belbeck L, McWade D. Intrinsic nervous control of migrating myoelectric complexes. *Am J Physiol.* 1981;241(1):G16-23.
- Sarna SK, Condon RE, Cowles V. Colonic migrating and non-migrating motor complexes in dogs. *Am J Physiol.* 1984;9:G355-60.
- Sarna SK. Myoelectric correlates of colonic motor complexes and contractile activity. *Am J Physiol.* 1986;250:G213-20.
- Sarna SK. Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G545-55.
- Sarna SK und Shi X. Function and regulation of colonic contractions in health and disease. In: Johnson LR (Hrsg). *Physiology of the gastrointestinal tract.* 3 Aufl. Academic Press; 2006. p. 965-82.
- Sarna SK. Colonic Motility. From bench side to bedside. Morgan & Claypool Life Sciences;2010.
- Schemann M. Neurophysiologie des enterischen Nervensystems. *Verdauungskrankheiten.* 1990;8(6):183-92.

- Schemann M (2000): Enterisches Nervensystem und Innervation des Magen-Darm-Traktes. In: Engelhardt W, Breves G, Hrsg. Physiologie der Haustiere. 1. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; S. 308-316.
- Schemann M. Das enterische Nervensystem. 2014. <<https://www.spektrum.de/lexikon/ernaehrung/das-enterische-nervensystem/2530>>.
- Schmidt PT und Holst JJ. Use of antagonists to define tachykininergic control of intestinal motility in pigs. *Peptides* 1997;18(3):373–9.
- Schneider S, Wright CM, Heuckeroth RO. Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function. *Annu Rev Physiol.* 2019;81: 235-59.
- Singh S und Mandal MB. In vitro study of acetylcholine and histamine induced contractions in colon and rectum of adult and neonate rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2013;57(2):104–13.
- Smith TK, Reed JB, Sanders KM. Interaction of two electrical pacemakers in muscularis of canine proximal colon. *Am J Physiol.* 1987;252:C290-9.
- Snape WJ, Kim BH, Willenbacher R, Koelbel CB, Mayer EA, Walsh JH. Differences in the Response of Proximal and Distal Rabbit Colonic Muscle After Electrical Field Stimulation. *Gastroenterology.* 1989;96(2):321–6.
- Solnes LB, Sheikhabaei S, Ziessman HA. Nuclear Scintigraphy in Practice: Gastrointestinal Motility. *Am J Roentgenol.* 2018;211(2):260-6.
- Surprenant A. Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:117-40.
- Spencer NJ und Bywater RA. Enteric nerve stimulation evokes a premature colonic migrating motor complex in mouse. *Neurogastroenterol Motil.* 2002;14:657-65.
- Spencer NJ, Nicholas SJ, Sia TC, Staikopoulos V, Kyloh M, Beckett EA. By what mechanism does ondansetron inhibit colonic migrating motor complexes: does it require endogenous serotonin in the gut wall? *Neurogastroenterol Motil.* 2013;25:677-85.
- Spencer NJ, Dinning PG, Brookes SJ, Costa M. Insight into the mechanisms underlying colonic motor patterns. *J Physiol.* 2016;594:4099-116.
- Spreckley E und Murphy KG. The L-Cell in nutritional sensing and the regulation of appetite. *Front Nutr.* 2015;2:23.
- Sri Paran T, Rolle U, Puri P. Age-related changes in the myenteric plexus of the porcine bowel. *J Pediatr Surg.* 2009;44(9):1771-7.
- Stevens CE, Argenzio RA, Roberts MC. Comparative physiology of the mammalian colon and suggestions for animal models of human disorders. *Clin Gastroenterol.* 1986;15(4):763–85.
- Szurszewski JH. A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol.* 1969;217(6):1757–63.
- Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoort C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut.* 2006;55: 327-333.
- Takeuchi T, Tanaka K, Nakajima H, Matsui M, Azuma YT. Yasu-Taka (2007): M2 and M3 muscarinic receptors are involved in enteric nerve-mediated contraction of the mouse ileum: Findings obtained with muscarinic-receptor knockout mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(1):G154-64.



- Timmermans JP, Adriaensen D, Cornelissen W, Scheuermann DW. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comparative biochemistry and physiology. Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997;118(2):331–40.
- Timmermans JP, Barbiere M, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, Mayer B, De Groodt-Lasseel MH. Distribution pattern, neurochemical features and projections of nitrergic neurons in the pig small intestine. *Ann Anat.* 1994;176(6):515–25.
- Tiso M und Schechter AN. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PloS one.* 2015;10(3):e0119712.
- Tough IR, Forbes S, Tolhurst R, Ellis M, Herzog H, Bornsteini JC, Cox HM. Endogenous peptide YY and neuropeptide Y inhibit colonic ion transport, contractility and transit differentially via Y1 and Y2 receptors. *Br J Pharmacol.* 2011;164:471–84.
- Trudrung P, Furness JB, Pompolo S, Messenger JP. Locations and chemistries of sympathetic nerve cells that project to the gastrointestinal tract and spleen. *Arch Histol Cytol.* 1994;57:139–50.
- Uchiyama T und Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res.* 2004;40 (6):237–47.
- Ventura-Martínez R, Rodríguez R, González-Trujano ME, Ángeles-López GE, Déciga-Campos M, Gómez C. Spasmogenic and spasmolytic activities of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* and *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* methanolic extracts on the guinea pig ileum. *J Ethnopharmacol.* 2017;196:580–65.
- Vincent RP, Ashrafian H, le Roux CW. Mechanisms of disease: The role of gastrointestinal hormones in appetite and obesity. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008;5:268–77.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 2003;299(5603):76.
- Wade PR und Wood J. Electrical behavior of myenteric neurons in guinea pig distal colon. *Am J Physiol.* 1988(a);254:G522–30.
- Wade PR und Wood JD. Synaptic behavior of myenteric neurons in guinea pig distal colon. *Am J Physiol.* 1988(b);255:G184–90.
- Wade PR und Wood JD. Actions of serotonin and substance P on myenteric neurons of guinea-pig distal colon. *Eur J Pharmacol.* 1988(c);148(1):1–8.
- Wang XY, Paterson C, Huizinga JD. Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 2003;15(5):531–43.
- Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci.* 2000(a);20:1393–1403.
- Ward SM, Ordog T, Koh SD, Baker SA, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol.* 2000(b);525:355–61.

- Ward SM und Sanders KM. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *J Physiol.* 2006;576:675-82.
- Wardell CF, Bornstein JC, Furness JB. Projections of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive neurons in guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res.* 1994;278(2):379-87.
- Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. *Gastroenterology* 1995;109(3):866-75.
- Wattchow DA, Porter AJ, Brookes SJ, Costa M. The polarity of neurochemically defined myenteric neurons in the human colon. *Gastroenterology.* 1997;113(2):497-506.
- Wedel T, Roblick U, Gleiss J, Schiedeck T, Bruch HP, Kühnel W, Krammer HJ. Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann Anat.* 1999;181(4):327-37.
- White H, Rainey, WR, Monaghan, B and Harris, AS. Observations on the nervous control of the ileocecal sphincter and on intestinal movements in an unanesthetized human subject. *Am J Physiol.* 1934;108:449-457.
- Wood JD. Physiology of Enteric Nervous System. In: Johnson LR, Hrsg. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 3. Aufl. Raven Press, New York. Bd. 1;1994. p.423-82.
- Wood JD, Alpers DH, Andrews PLR. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut.* 1999;45:II6-II16.
- Wood JD. Integrative functions of the enteric nervous system. In: Johnson LR, Hrsg. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 4. Aufl. Elsevier, Oxford;2006. p.665-83.
- Wood JD. Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008;24(2):149-58.
- Xue L, Farrugia G, Sarr MG, Szurszewski JH. ATP is a mediator of the fast inhibitory junction potential in human jejunal circular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1999;276:G1373-9.
- Yu Y, Chen JH, Li H, Yang Z, Du X, Hong L, Liao H, Jiang L, Shi J, Zhao L, Tan S, Luo H, Huizinga JD. Involvement of 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in colonic motor patterns in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2015;27(7):914-28.
- Zielinska M, Jarmuz A, Salaga M, Lipkowski AW, Fichna J. Mixed MOP/DOP agonist biphalin elicits anti-transit effect in mouse models mimicking diarrhea-predominant irritable bowel syndrome symptoms. *Pharmacol Rep.* 2016;68(1):32-6.
- Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med.* 1995;1(8):804-9.

## Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. Helga Pfannkuche sowie unserem Institutsdirektor Herrn Professor Dr. Gotthold Gäbel aussprechen. Sie standen mir stets als Mentoren auf dem Weg zum Tierarzt zur Seite und boten mir die Möglichkeit und all Ihre Unterstützung, um meine Dissertation mit Erfolg am Institut für Veterinär-Physiologie zu vollenden. Ein besonderer Dank gilt allen MitarbeiterInnen und DoktorandInnen des Veterinär-Physiologischen Instituts. Ihr wart stets meine Kollegen, Freunde und Helfer in allen Belangen. Liebe Petra, Jana, Anke, Ines, Szilvi, 3x Franzi, Basti, Caro und Anja, sowie Prof. Dr. Cermak, Reiko, Jörg, Wolfgang, Ralf, Carsten und Martin, es war eine herrliche Zeit.

Lieber Professor Dr. Jonas Obleser, welch ein Glück, dass deine Tochter und mein Sohn dieselbe Krabbelgruppe besuchten. Ich danke dir für deinen stets kompetenten fachlichen Rat bezüglich meiner Statistik.

Herrn Christian Hahn von der Fleischerei Hahn in Otterwisch danke ich für die Möglichkeit zur Gewinnung des Darmmaterials.

Herrn Professor Dr. Axel Sobiraj möchte ich danken für seine stets aufrichtigen und motivierenden Worte in meiner Zeit an der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Universität Leipzig. Liebe Kolleginnen und Kollegen aus der AGTK, ihr wart einfach spitze und wir haben eine tolle Zeit gemeinsam durchlaufen.

Frau Professor Dr. Almuth Einspanier, Ihnen möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Sie haben mich in all der Zeit auf dem Weg zum Tierarzt und Dr. med. vet. unterstützt, wann immer es nötig war.

Meine Kollegen der Zoetis Deutschland GmbH haben mich kontinuierlich und mit aller Kunst der guten Motivationsschule sowie dem nötigen Freiraum unterstützt und ermuntert, meine Dissertation berufsbegleitend abzuschließen. Lieber Alois, Stephan, Eckhard (*Primus inter pares*), Christian, Luis, Torsten, Ansgar, Roland, Willehad, Albrecht und Marcus, ich danke euch sehr.

Meinen Eltern Bärbel und Andreas Otto sowie meinen Großeltern Brunhilde und Roland (†) Ruderisch möchte ich von Herzen Danke sagen für die Unterstützung, um zu dem zu werden, der ich heute bin.

Meine Schwiegereltern Angelika und Dr. Heribert (†) Breuer („Die größte Leistung bei einer Doktorarbeit ist es, sie zu beenden“): Danke für eure Art, mich anzuspornen und mit all eurer Hilfe dazu beizutragen, meine Dissertation zum Abschluss zu bringen.

Meiner Ehefrau Dr. Julia Breuer und meinen Kindern Linus und Timon gebührt der größte Dank. Julia, danke für dein unermüdliches und immer konstruktives Lektorat sowie für deine immer positive Art, mit den zeitlichen Entbehrungen in unserem Familienleben umzugehen, welche diese Aufgabe mit sich brachte. Ohne dich wäre die Diss nicht fertig geworden. Lieber Linus und lieber Timon, ich bin stolz darauf, euer Vater zu sein.

Es lohnt sich, für seine Ziele „am Ball zu bleiben“.